

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



ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
DERGİSİ

JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY
OF
ANKARA UNIVERSITY

Cilt / Vol : 49
Sayı / No : 1
Yıl / Year : 2025

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



ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
DERGİSİ

JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY
OF
ANKARA UNIVERSITY

Cilt / Vol: 49
Sayı / No: 1
Yıl / Year: 2025

ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ DERGİSİ

Cilt: 49, Sayı: 1, Yıl: 2025

(Ankara Ecz. Fak. Derg.)

eISSN: 2564-6524

ISSN: 1015-3918 (1971-2010)

Sahibi:

Prof. Dr. Asuman BOZKIR

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
06560, Yenimahalle, Ankara, Türkiye*

Baş Editör:

Prof. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL TÜRK

*Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
06560, Yenimahalle, Ankara, Türkiye*

Tel: +90 312 203 31 52

Faks: +90 312 213 10 81

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

efd.editor@ankara.edu.tr

Yardımcı Editörler:

Doç. Dr. Işıl ÖZAKÇA GÜNDÜZ

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

Doç. Dr. Ash KOÇ

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

Dr. Fatma DOĞANÇ

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

ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ DERGİSİ

Cilt: 49, Sayı: 1, Yıl: 2025

(Ankara Ecz. Fak. Derg.)

eISSN: 2564-6524

ISSN: 1015-3918 (1971-2010)

Alan Editörleri:

Prof. Dr. Marcello LOCATELLI

Chieti-Pescara "G.d'Annunzio" Üniversitesi,
Eczacılık Bölümü

e-posta: marcello.locatelli@unich.it

Prof. Dr. Ebru ARIOĞLU İNAN

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmakoloji Anabilim Dalı

e-posta: arioglu@ankara.edu.tr

Doç. Dr. İlker ATEŞ

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

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

Doç. Dr. Banu KAŞKATEPE

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

e-posta: bkaskatepe@ankara.edu.tr

Doç. Dr. Zühal KILIÇ KURT

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı

e-posta: zkurt@ankara.edu.tr

Doç. Dr. Burçin ERGENE

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmakognozi Anabilim Dalı

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

Doç. Dr. Sezen YILMAZ SARIALTIN

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

e-posta: sznyilmaz@ankara.edu.tr

Dr. Öğr. Üyesi Derya ÇİÇEK POLAT

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Botanik Anabilim Dalı

e-posta: polatd@ankara.edu.tr

Dr. Rafal Jerzy KOPIASZ

Warsaw Teknoloji Üniversitesi, Polimer Kimya
ve Teknoloji Bölümü

e-posta: rafal.kopiasz@pw.edu.pl

Araş. Gör. Murat Sefa KARAASLAN

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

e-posta: mskaraaslan@ankara.edu.tr

Araş. Gör. Busenaz DELİ

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Eczacılık İşletmeciliği Anabilim Dalı

e-posta: bndeli@ankara.edu.tr

Prof. Dr. Natalizia MICELI

Messina Üniversitesi, Kimya, Biyoloji, Eczacılık ve
Çevre Bilimleri Bölümü

e-posta: natalizia.miceli@unime.it

Doç. Dr. Marco Lucio LOLLI

Turin Üniversitesi, Bilim ve İlaç Teknoloji
Bölümü

e-posta: marco.lolli@unito.it

Doç. Dr. Arzu Zeynep KARABAY

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya
Anabilim Dalı

e-posta: akarabay@ankara.edu.tr

Doç. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik
Kimya Anabilim Dalı

e-posta: gcaglayan@ankara.edu.tr

Doç. Dr. Gülin AMASYA-ÇELİKTEN

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

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

Doç. Dr. Aysu SELÇUK

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Klinik
Eczacılık Anabilim Dalı

e-posta: aysuselcuk@ankara.edu.tr

Dr. Öğr. Üyesi Belma PEHLIVANOVIC KELLE

Sarajevo Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmakoloji ve Klinik Eczacılık Bölümü

e-posta: belma.pehlivanovic@ffsa.unsa.ba

Öğr. Gör. Dr. Muammer ÇALIKUŞU

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık
İşletmeciliği Anabilim Dalı

e-posta: mcalikusu@ankara.edu.tr

Araş. Gör. Sevgi TEKTAŞ

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

e-posta: stektas@ankara.edu.tr

Araş. Gör. Selenay SADAK

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik
Kimya Anabilim Dalı

e-posta: ssadak@ankara.edu.tr

ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ DERGİSİ

Cilt: 49, Sayı: 1, Yıl: 2025

(Ankara Ecz. Fak. Derg.)

eISSN: 2564-6524

ISSN: 1015-3918 (1971-2010)

Editorial Danışma Kurulu:

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

ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ DERGİSİ

Cilt: 49, Sayı: 1, Yıl: 2025

(Ankara Ecz. Fak. Derg.)

eISSN: 2564-6524

ISSN: 1015-3918 (1971-2010)

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 bir yayın ortamıdır. Bilimsel toplantılarda sunulan bildirimler, konferans bildirimleri ve toplantı özetleri supleman özel sayısı olarak dergide yayımlanabilir. 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 yayım kurallarına uymalıdır.

Tarandığı İndeksler

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

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

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/jfpanu>

JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY OF ANKARA UNIVERSITY

Volume: 49, Issue: 1, Year: 2025

(J. Fac. Pharm. Ankara)

eISSN: 2564-6524

ISSN: 1015-3918 (1971-2010)

Owner:

Prof. Dr. Asuman BOZKIR

*Ankara University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology
06560 Yenimahalle, Ankara, Türkiye*

Editor-in-Chief:

Prof. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL TÜRK

*Ankara University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology
06560 Yenimahalle, Ankara, Türkiye*

Phone: +90 312 203 31 52

Fax: +90 312 213 10 81

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

efd.editor@ankara.edu.tr

Associate Editors:

Assoc. Prof. Dr. Işıl ÖZAKÇA GÜNDÜZ

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology

e-mail: ozakca@ankara.edu.tr

Assoc. Prof. Dr. Aslı KOÇ

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry

e-mail: akoc@ankara.edu.tr

PhD. Fatıma DOĞANÇ

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry

e-mail: doganc@ankara.edu.tr

JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY OF ANKARA UNIVERSITY

Volume: 49, Issue: 1, Year: 2025

(J. Fac. Pharm. Ankara)

eISSN: 2564-6524

ISSN: 1015-3918 (1971-2010)

Section Editors:

Prof. Dr. Marcello LOCATELLI

University "G.d'Annunzio" of Chieti-Pescara,
Department of Pharmacy
e-mail: marcello.locatelli@unich.it

Prof. Dr. Ebru ARIÖGLU İNAN

Ankara University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmacology
e-mail: arioglu@ankara.edu.tr

Assoc. Prof. Dr. İlker ATEŞ

Ankara University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmaceutical Toxicology
e-mail: iates@pharmacy.ankara.edu.tr

Assoc. Prof. Dr. Banu KAŞKATEPE

Ankara University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmaceutical Microbiology
e-mail: bkaskatepe@ankara.edu.tr

Assoc. Prof. Dr. Zühal KILIÇ KURT

Ankara University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmaceutical Chemistry
e-mail: zkurt@ankara.edu.tr

Assoc. Prof. Dr. Burçin ERGENE

Ankara University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmacognosy
e-mail: ergene@pharmacy.ankara.edu.tr

Assoc. Prof. Dr. Sezen YILMAZ SARIALTIN

Ankara University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmaceutical Toxicology
e-mail: sznyilmaz@ankara.edu.tr

Assist. Prof. Dr. Derya ÇİÇEK POLAT

Ankara University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmaceutical Botany
e-mail: polatd@ankara.edu.tr

PhD. Rafal Jerzy KOPIASZ

Warsaw University of Technology, Department of
Polymer Chemistry and Technology
e-mail: rafal.kopiasz@pw.edu.pl

Res. Assist. Murat Sefa KARAASLAN

Ankara University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmaceutical Microbiology
e-mail: mskaraaslan@ankara.edu.tr

Res. Assist. Busenaz DELİ

Ankara University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmacy Business Administration
e-mail: bndeli@ankara.edu.tr

Prof. Dr. Natalizia MICELI

University of Messina, Department of Chemical,
Biological, Pharm. and Environmental Sciences
e-mail: natalizia.miceli@unime.it

Assoc. Prof. Dr. Marco Lucio LOLLI

University of Turin, Department of Science and
Drug Technology
e-mail: marco.lolli@unito.it

Assoc. Prof. Dr. Arzu Zeynep KARABAY

Ankara University, Faculty of Pharmacy,
Department of Biochemistry
e-mail: akarabay@ankara.edu.tr

Assoc. Prof. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN

Ankara University, Faculty of Pharmacy,
Department of Analytical Chemistry
e-posta: gcaglayan@ankara.edu.tr

Assoc. Prof. Dr. Gülin AMASYA-ÇELİKTEKİN

Ankara University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmaceutical Technology
e-mail: gamasya@pharmacy.ankara.edu.tr

Assoc. Prof. Dr. Aysu SELÇUK

Ankara University, Faculty of Pharmacy,
Department of Clinical Pharmacy
e-mail: aysuselcuk@ankara.edu.tr

Assist.Prof.Dr.Belma PEHLIVANOVIC KELLE

University of Sarajevo, Fac. of Pharmacy, Depart.
of Pharmacology and Clinical Pharmacy
e-mail: belma.pehlivanovic@ffsa.unsa.ba

Lec. Dr. Muammer ÇALIKUŞU

Ankara University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmacy Business Administration
e-mail: calikusu@ankara.edu.tr

Res. Assist. Sevgi TEKTAŞ

Ankara University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmaceutical Technology
e-mail: stektas@ankara.edu.tr

Res. Assist. Selenay SADAK

Ankara University, Faculty of Pharmacy,
Department of Analytical Chemistry
e-mail: ssadak@ankara.edu.tr

JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY OF ANKARA UNIVERSITY

Volume: 49, Issue: 1, Year: 2025

(J. Fac. Pharm. Ankara)

eISSN: 2564-6524

ISSN: 1015-3918 (1971-2010)

Editorial Advisory Board:

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

JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY OF ANKARA UNIVERSITY

Volume: 49, Issue: 1, Year: 2025

(J. Fac. Pharm. Ankara)

eISSN: 2564-6524

ISSN: 1015-3918 (1971-2010)

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 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. Proceeding of scientific meetings, conference paper, and meeting abstract may be published as special issues of supplements to the journal. All the articles appeared in this journal are published on the responsibility of the author(s). The manuscript submitted to the journal should not be published previously as a whole or in part and not be submitted elsewhere. The manuscripts should be prepared in accordance with the requirements specified.

Indexing and Abstracting

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

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

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/jfpanu>

İÇİNDEKİLER / CONTENTS 49(1), 2025

Özgün Makaleler / Original Articles

Sayfa / Page

- S. Irem KAYA, Ece OZKAN, Nurgul K. BAKIRHAN, Sibel A. OZKAN - **DETAILED ELECTROCHEMICAL BEHAVIOR INVESTIGATION AND DETERMINATION OF ANTIPSYCHOTIC DRUG PALIPERIDONE ON A GLASSY CARBON ELECTRODE** - CAMSI KARBON ELEKTROT İLE ANTİPSİKOTİK İLAÇ PALİPERİDONUN AYRINTILI ELEKTROKİMYASAL DAVRANIŞININ ARAŞTIRILMASI VE TAYİNİ 1
- Çağla Begüm APAYDIN, Gozde HASBAL CELİKOK, Tugba YILMAZ OZDEN - **SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND CHOLINESTERASE INHIBITORY EFFECTS OF IBUPROFEN-BASED SPIROTHIAZOLIDINONES** - İBUPROFEN TÜREVİ SPIROTHIAZOLIDİNONLARIN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE KOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR ETKİLERİ 12
- Ravichandran VEERASAMY, Raghuraman SEENIVASAN, Harish RAJAK, Parasuraman PAVADAI, Prabha THANGAVELU - **MUSHROOM DERIVED COMPOUNDS UNVEILED NARINGIN AS A POTENTIAL MULTI-TARGETED ANTI-BREAST CANCER COMPOUND - AN IN-SILICO APPROACH** - MANTAR TÜRETİLMİŞ BİLEŞİKLER, NARİNGİNİN POTANSİYEL ÇOK HEDEFLİ MEME KANSERİ KARŞITI BİR BİLEŞİK OLDUĞUNU ORTAYA ÇIKARDI - BİR İN-SİLİCO YAKLAŞIMI 21
- Burak KUZU, Aybek YİĞİT, Fuat KARAKUŞ - **DESIGN, SYNTHESIS, AND EVALUATION OF ANTIBACTERIAL POTENTIAL OF HYDRAZONE-TETHERED PYRAZOLE-THIAZOLE DERIVATIVES** - HİDRAZON BAĞLI PİRAZOL-TİYAZOL TÜREVLERİNİN TASARIMI, SENTEZİ VE ANTİBAKTERİYEL POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ 42
- Seçkin ENGİN, Elif Nur BARUT, Merve İSMAİLOĞLU KARACA, Melis Nazlı YANIK - **VILDAGLIPTIN IMPROVES DETRUSOR CONTRACTILITY IN A MOUSE MODEL OF CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED OVERACTIVE BLADDER** - VİLDAGLIPTİN, SİKLOFOSFAMİD İLE İNDÜKLENEN AŞIRI AKTİF MESANE FARE MODELİNDE DETRÜSÖR KONTRAKTİLİTESİNİ İYİLEŞTİRİR 53
- Uğur KAYIŞ, Tammam SİPAHİ, Suzan ÖKTEN, Fatma KAYNAK ONURDAĞ - **ACINETOBACTER BAUMANNII İZOLATLARINDA DNA GYRASE DİRENÇ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI** - INVESTIGATION OF DNA GYRASE RESISTANCE GENES IN ACINETOBACTER BAUMANNII ISOLATES 62
- Halilibrahim Aykut ŞAHİN, Gülen İrem KAYA - **ECZANE VE AKTARLARDA SATILAN BAZI SUSAM YAĞI ÖRNEKLERİ ÜZERİNDE KALİTE KONTROL ÇALIŞMALARI** - QUALITY CONTROL STUDIES ON SOME SESAME OIL SAMPLES SOLD IN PHARMACIES AND HERBALISTS 71
- Merve AKDOĞAN, Enes TEKMAN, Hafize YUCA, Songül KARAKAYA, Gülnur EKŞİ, Cavit KAZAZ - **EXPLORATION OF HALLUCINOGENIC COMPOUNDS IN PEGANUM HARMALA, A POPULAR INCENSE IN FOLK CULTURE, COUPLED WITH ANATOMICAL ANALYSIS** - HALK KÜLTÜRÜNDE POPÜLER BİR TÜTSÜ OLAN PEGANUM HARMALA'DAKİ HALÜSİNOJENİK BİLEŞİKLERİN ANATOMİK ANALİZLERLE BERABER ARAŞTIRILMASI 79
- Tilbe ÇEVİKELLİ, Nurdan TEZCAN, Umay Merve GÜVEN, Serpil DEMİRCİ KAYIRAN - **DEVELOPMENT AND IN VITRO EVALUATION OF OLEUM ROSMARINI BASED TOPICAL EMULGEL FORMULATION FOR RHEUMATIC DISEASE** - ROMATİK HASTALIKLARA YÖNELİK OLEUM ROSMARİNİ BAZLI TOPİKAL EMÜLJEL FORMÜLASYONUNUN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ 91
- Fatima DOGANC, Hakan GOKER - **REGIOISOMERIC N-ALKYLATION OF SOME INDAZOLES** - BAZI İNDAZOLLERİN REGİOİZOMERİK N-ALKİLASYONU 103
- Yağmur ÖZKAYA, Gülbin ÖZÇELİKAY - **YAŞLILARDA AKILCI İLAÇ KULLANIMINDA ECZACI SORUMLULUĞU** - PHARMACIST RESPONSIBILITY FOR RATIONAL MEDICATION USE IN THE ELDERLY 109

Aslı CAN AĞCA, Derya ALTAY, Başar KARACA, Sibel ÖZDAŞ, İpek CANATAR - CISTUS CRETICUS L.: ANTI-OBESITY, ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM PROPERTIES - <i>CISTUS CRETICUS L.: ANTİÖBEZİTE, ANTİMİKROBİYAL VE ANTİBİYOFİLM ÖZELLİKLERİ</i>	119
Derlemeler / Reviews	
Şirin Hatice GÜREL, Derya ÇİÇEK POLAT - NIGELLA SATIVA L.: AN OVERVIEW - <i>NİGELLA SATİVA L.: GENEL BAKIŞ</i>	133
Yeşim BULUT, Muhammed Yunus BEKTAY - PHARMACIST INTERVENTIONS TO IMPROVE CLINICAL OUTCOMES IN HEART FAILURE - <i>KALP YETERSİZLİĞİNDE KLİNİK SONUÇLARI İYİLEŞTİRMEYE YÖNELİK ECZACI MÜDAHALELERİ</i>	146
Eda TURAN AYHAN, Sibel İLBASMIŞ TAMER - POLİDOPAMİN TEMELLİ NANOSİSTEMLERİN İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM OLARAK KULLANILMA VE TEDAVİ POTANSİYELLERİ - <i>UTILIZATION OF POLYDOPAMINE-BASED NANOSYSTEMS AS DRUG DELIVERY SYSTEMS AND THEIR THERAPEUTIC POTENTIALS</i>	155
Aybüke ÖZTÜRK, Ebru UZUNHİSARCIKLI - SJÖGREN SENDROMUNDA GÜNCEL İLAÇ TEDAVİSİ - <i>CURRENT DRUG TREATMENT IN SJÖGREN'S SYNDROME</i>	171
Mert KARACIK, Begüm EVRANOS AKSÖZ - 2013-2024 YILLARI ARASINDA FDA ONAYI ALMIŞ ANTİDEPRESANLAR VE YENİ ANTİDEPRESAN İLAÇ GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI - <i>FDA APPROVED ANTIDEPRESSANTS AND NEW ANTIDEPRESSANT DRUG DEVELOPMENT STUDIES BETWEEN 2013-2024</i>	184
Ömer Furkan GÜVERTİ, Didem DELİORMAN ORHAN - FLAVONOİTLERİN AKCİĞER KANSERİNE KARŞI ETKİLERİ - <i>THE EFFECTS OF FLAVONOIDS AGAINST LUNG CANCER</i>	198
Gökçe DURMUŞ, İrem ÖZKAN, Özge CEMİLOĞLU ÜLKER - KOKU BİLEŞENLERİNİN FOTOTOKSİK (FOTOİRİTAN) VE FOTOALERJİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ - <i>EVALUATION OF PHOTOTOXIC (PHOTOIRRITANT) AND PHOTOALLERGIC EFFECTS OF FRAGRANCE MATERIALS</i>	211
Aysel YILMAZ, Necibe Başaran MUTLU AĞARDAN, Sevgi TAKKA - AN OVERVIEW OF 3D PRINTING TECHNOLOGIES FOCUSING MULTIDRUG-LOADED 3D PRINTED DOSAGE FORMS - <i>ÇOKLU İLAÇ YÜKLÜ 3D BASKILI DOZAJ FORMLARINA ODAKLANAN 3D BASKI TEKNOLOJİLERİNE GENEL BAKIŞ</i>	228



DETAILED ELECTROCHEMICAL BEHAVIOR INVESTIGATION AND DETERMINATION OF ANTIPSYCHOTIC DRUG PALIPERIDONE ON A GLASSY CARBON ELECTRODE

CAMSI KARBON ELEKTROT İLE ANTİPSİKOTİK İLAÇ PALİPERİDONUN AYRINTILI
ELEKTROKİMYASAL DAVRANIŞININ ARAŞTIRILMASI VE TAYİNİ

S. Irem KAYA^{1*} , Ece OZKAN² , Nurgul K. BAKIRHAN¹ , Sibel A. OZKAN³ 

¹University of Health Sciences, Gulhane Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, 06018, Ankara, Türkiye

²Medipol University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, 06050, Ankara, Türkiye

³Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, 06560, Ankara, Türkiye

ABSTRACT

Objective: A sensitive and cost-effective electrochemical method was developed on a bare glassy carbon electrode (GCE) for the determination of paliperidone (PAL), an antipsychotic drug used in the primary schizophrenia treatment affecting the whole world.

Material and Method: The oxidation studies carried out in pH 8 phosphate buffer solution (PBS) by cyclic voltammetry (CV) showed that the oxidation reaction of PAL is a process including the same number of electrons and protons. The electrochemical detection of PAL was carried out by differential pulse voltammetry (DPV).

Result and Discussion: The linearity range was between 1 μ M and 100 μ M. The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) values were calculated as 2.41×10^{-7} M and 8.033×10^{-7} M, respectively. The applicability of the developed method was confirmed by using it on synthetic human serum. The relative standard deviation (RSD) values were less than 2%. The selectivity of the analysis was demonstrated over against interfering substances such as ascorbic acid, KNO_3 , $MgCl_2$, paracetamol, dopamine, Na_2SO_4 , and uric acid with recovery% and RSD% values in the range 98.32%-101.56% and 0.15%-1.99%, respectively. The proposed method provided high sensitivity for PAL and is the first reported method for the electroanalysis of PAL.

Keywords: Differential pulse voltammetry, electrochemistry, glassy carbon electrode, paliperidone

ÖZ

Amaç: Tüm dünyayı etkileyen şizofreninin birincil tedavisinde kullanılan antipsikotik ilaç olan paliperidonun (PAL) tayini için yalın camsi karbon elektrot (CKE) kullanılarak hassas ve uygun maliyetli bir elektrokimyasal yöntem geliştirildi.

Gereç ve Yöntem: pH 8 fosfat tampon çözeltisinde dönüşümlü voltametri (DV) ile gerçekleştirilen oksidasyon çalışmaları, PAL'ın oksidasyon reaksiyonunun iki elektron ve iki protonlu bir süreç olduğunu gösterdi. PAL'ın elektrokimyasal tespiti diferansiyel puls voltametri (DPV) ile gerçekleştirildi.

Sonuç ve Tartışma: Doğrusal aralık 1×10^{-6} M ile 1×10^{-4} M arasında bulundu. Teşhis sınırı (TS) ve tayin alt sınırı (TAS) değerleri sırasıyla 2.41×10^{-7} M ve 8.033×10^{-7} M olarak hesaplandı. Geliştirilen yöntemin uygulanabilirliği sentetik insan serumu üzerinde kullanılarak doğrulandı. Bağlı standart

* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: S. Irem KAYA
e-mail / e-posta: ikaya19.07@hotmail.com, Phone / Tel.: +903123046073

sapma (BSS) değerleri %2'den azdı. Yöntemin seçiciliği, askorbik asit, KNO₃, MgCl₂, parasetamol, dopamin, Na₂SO₄ ve ürik asit gibi girişim etkili ajanların varlığında sırasıyla %98.32-%101.56 ve %0.15-%1.99 aralığında %geri kazanım ve %BSS değerleri ile gösterilmiştir. Önerilen yöntem PAL için yüksek hassasiyet sağlamıştır ve PAL'in elektroanalizi için bildirilen ilk yöntemdir.

Anahtar Kelimeler: Camsı karbon elektrot, diferansiyel darbe voltametrisi, elektrokimya, paliperidon

INTRODUCTION

Based on the World Health Organization's (WHO) official data in 2022, schizophrenia is a major disease affecting approximately 24 million people worldwide. In recent years, rapid advances in science, particularly neuroscience, have created several research areas to explore the brain neurobiological and neurocognitive processes underlying schizophrenia [1]. The primary treatment of schizophrenia is antipsychotic drugs (APS), and treatment outcomes are monitored by therapeutic drug monitoring (TDM) [2]. Schizophrenia is a chronic disease that requires long-term treatment with APS and often relapses [3].

Paliperidone (PAL; Figure 1) is risperidone's main metabolite, belonging to the second-generation class of antipsychotics and is prescribed for schizophrenia treatment [4]. PAL shows affinity for serotonin and dopamine receptors [5]. It has been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for both acute and long-term treatment of schizophrenia since 2006 [6]. The recommended dose of extended-release application of PAL is 6 mg/day. PAL's maximum plasma concentration (C_{max}) after a single dose application is 5.49 ng/ml. Based on the PAL-containing pharmaceutical products, the LD₅₀ value (rat, female) is 65 mg/kg [7]. The absolute bioavailability of PAL and its binding to plasma proteins have been reported to be 28% and 74%, respectively. In addition, 59% is excreted directly by the kidneys [8]. The active fraction during treatment is expressed as the sum of risperidone and PAL. In long-term treatments, disadvantages such as adverse reactions, poor drug compliance or tolerance may occur [3]. In order to reduce these side effects, the dose used should be controlled quickly and effectively. PAL is also a frequently encountered antipsychotic agent in suicide cases involving fatal poisoning. In such forensic cases, accurate determination of PAL concentration in the blood is mandatory to prove that PAL intoxication caused death [9].

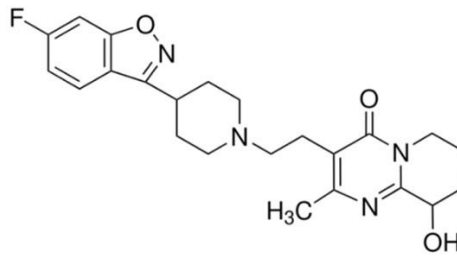


Figure 1. Molecular structure of PAL

As a result of literature reviews, single, double, and triple combination studies of PAL were found. Single studies of PAL in different pharmaceutical formulations by first-derivative spectrophotometric technique [6], pharmaceuticals by high-performance liquid chromatographic (HPLC) method [8], commercial formulations by reversed-phase liquid chromatographic (RP-LC) method [10], by high-performance thin-layer chromatographic (HPTLC) [4,11], pharmaceutical injection forms [5], by ultra-performance liquid chromatography (UPLC), liquid chromatography-quadrupole orbitrap mass spectrometry (LC-Q-Orbitrap-MS) method in human blood [9] and ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole orbitrap mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) method in beagle dog plasma [3]. Dual and ternary analyses of PAL and risperidone from human plasma and urine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method [12], and PAL, risperidone and olanzapine from human plasma by LC-MS/MS method [13] were found, respectively.

Only chromatographic methods were noted in the literature, and no electrochemical analyses were performed. Furthermore, the studied methods either require costly instruments or extra sample preparation techniques. Therefore, there is a need for a fast, sensitive, selective, efficient and inexpensive method for PAL analysis in complex matrices.

In this study, PAL was characterized by the cyclic voltammetric method and analyzed from standard solution and commercial sample of human serum by DPV method using a bare glassy carbon electrode (GCE). The electrochemical behavior of PAL was analyzed in terms of pH and scan rate effect. Additionally, the possible oxidation mechanism was evaluated. The proposed method is easy to apply, quick, sensitive, and reproducible for routine analysis.

MATERIAL AND METHOD

Reagents and Chemicals

Active pharmaceutical ingredients of PAL, risperidone (RIS), droperidol (DRO), haloperidol (HAL), and benperidol (BEN) were purchased from Sigma-Aldrich. All other chemicals purchased from Sigma-Aldrich and their intended uses are as follows: Methanol (MeOH; $\geq 99.8\%$) to prepare stock drug solutions, acetonitrile (ACN; $\geq 99.9\%$) to precipitate serum proteins; sulfuric acid (H_2SO_4 ; $\geq 99.99\%$), acetic acid ($\geq 99.0\%$), sodium acetate trihydrate ($\geq 99.0\%$), phosphoric acid ($\geq 99.0\%$), sodium dihydrogen phosphate dihydrate ($\geq 98.0\%$), disodium hydrogen phosphate dihydrate ($\geq 99.0\%$), and sodium hydroxide ($\geq 97.0\%$) for the preparation of buffer solutions; ascorbic acid, dopamine, uric acid ($\geq 99.0\%$), paracetamol, magnesium chloride ($\geq 99.0\%$), sodium sulfate ($\geq 99.0\%$), potassium nitrate ($\geq 99.0\%$) for the preparation of interference solutions, drug-free commercial human serum for biological sample application.

10^{-3} M PAL stock solution was prepared in MeOH. Measurement solutions were prepared in desired buffer solutions, keeping the MeOH ratio constant at 20%. Various buffer solutions of H_2SO_4 (pH 0.3, 1.0), phosphate buffer solution (PBS, pH 1.5–8.0), acetate buffer solution (ABS, pH 3.7–5.7), and Britton-Robinson buffer (BRB, pH 2.0–12.0) were used in electrochemical measurements.

Apparatus

A potentiostat by PalmSens BV (Netherlands) using PSTrace 5.9 software was employed for the electrochemical measurements of CV and DPV. A three-electrode cell system consisting of a GCE (diameter=3.0 mm), a reference electrode of Ag/AgCl electrode (3 M KCl), and a counter electrode of platinum wire was connected to the potentiostat. They were all purchased from BASi Inc. (USA). A precision balance from Ohaus Instruments (Shanghai, China) was utilized to weigh solid chemicals. A pH-meter device (pH/ion meter S220) by Mettler-Toledo (Switzerland) was used to measure and adjust the pH values of buffer solutions. J.P. Selecta Corporation (Barcelona, Spain) and ISOLAB Laborgerate GmbH (Germany) provided a vortex mixer and ultrasonic bath.

The GCE surface cleaning was performed in two steps: Firstly, it was immersed in double distilled water:MeOH (1:1, v/v) mixture and kept in an ultrasonic bath for 15 min. After that, it was polished using a polish pad and alumina slurry. It was washed using distilled water and dried at 25°C .

The optimum measurement conditions for CV are as follows: Potential range: -0.2 V–1.2 V, step potential: 0.01 V, scan rate: 0.1 V/s. The optimum measurement conditions for DPV are as follows: Potential range: -0.2 V–1.0 V, step potential: 0.008V, pulse potential: 0.2 V, pulse time: 0.02 s, scan rate: 0.1 V/s.

Preparation Procedure of Commercial Human Serum Sample

5×10^{-4} M serum stock solution was prepared using 1000 μl of 5×10^{-3} M PAL solution, 3600 μl of drug-free commercial human serum, and 5400 μl of ACN. In order for the serum proteins to completely precipitate and separate, this prepared mixture was placed in a centrifuge tube and centrifuged (5000 rpm, 20 min). The resulting supernatant was used to prepare measurement solutions with the necessary dilutions. While preparing these solutions, the optimum buffer solution was used by keeping the MeOH ratio constant at 20%. Then, recovery studies were carried out by spiking standard PAL solutions at two different known concentrations.

RESULT AND DISCUSSION

PAL's Electrochemical Behavior on Bare GCE

In electrochemical analysis studies, a detailed examination of the electrochemical behavior of the studied electroactive drug is fundamental. For this purpose, the oxidative behavior of PAL was examined in pH 8 PBS, which is the optimum electrolyte environment. According to the CV voltammograms displayed in Figure 2, it is observed that PAL has two oxidation peaks that are not completely separated from each other in pH 8 PBS. The first peak is located at 0.79 V, and the other one is at 0.92 V. Despite this visible distinction in CV voltammograms, it appears as a merged peak in DPV voltammograms.

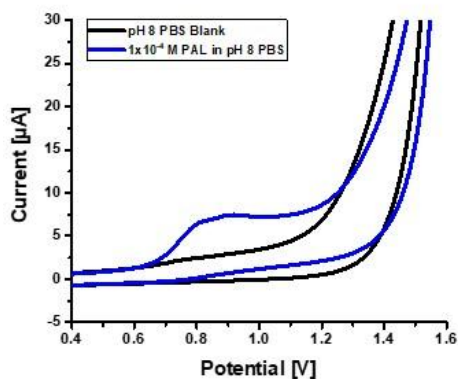


Figure 2. CV voltammograms of pH 8 PBS (black line) and 1×10^{-4} M PAL in pH 8 PBS (blue line)

Effect of pH

Analyzing how the target drug's electrochemical behavior is affected by the changes in the pH of the supporting electrolyte solution is an essential aspect of electrochemical analysis. For this purpose, the electrooxidation behavior of 1×10^{-4} M PAL was examined in various buffer solutions ranging from pH 0.3 to 12 on bare GCE. Peak potentials (E_p) and currents (I_p) of PAL were evaluated by making DPV measurements at changing pHs (Figure 3A and 3B). Accordingly, it is seen that with increasing pH values towards more basic pH, the PAL peak shifts towards lower potential and increases. As a result, pH 8 PBS, the environment where the highest peak was obtained, and the potential was at lower values (easier oxidation), was chosen as optimum. The relationship of E_p versus pH (Figure 3C) is explained with the equation below:

$$E_p \text{ (V)} = -0.0702 \text{ pH} + 1.2334; r=0.977 \text{ (pH } 0.3 - 12)$$

The fact that this equation's slope has a close value to 59 mV/pH (theoretically calculated value) suggests that the oxidation process involves the same amount of protons and electrons of PAL on GCE [14].

Effect of Scan Rate

Observing the effect of changes in scan rate (ν) on the electrochemical behavior of substances makes it possible to enlighten the oxidation mechanism and the number of electrons transferred. In order to observe the effect of ν , cyclic voltammetric responses of 1×10^{-4} M PAL were evaluated in the range of 5 to 1000 mV/s in pH 8 PBS on GCE. The I_p versus $\nu^{1/2}$ (Figure 4A) and $\log I_p$ versus $\log \nu$ (Figure 4B) relations are expressed in the following equations:

$$I_p \text{ (}\mu\text{A)} = 0.3105 \nu^{1/2} - 0.04707; r = 0.994$$

$$\log I_p \text{ (}\mu\text{A)} = 0.5418 \log \nu - 0.6734; r = 0.997$$

$$I_p \text{ (}\mu\text{A)} = 0.0096 \nu + 1.1718; r = 0.973$$

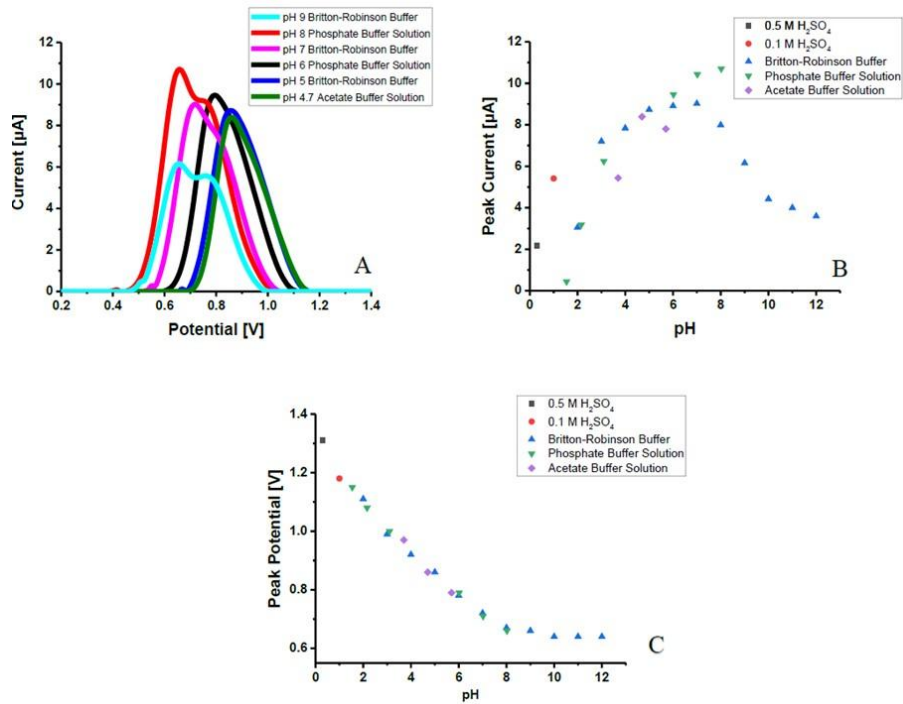


Figure 3. A) DPV voltammograms of 1×10^{-4} M PAL on GCE in pH 4.7 ABS, pH 5, 7, and 9 BRB, and pH 6 and 8 PBS; the plots of B) I_p versus pH and C) E_p versus pH (The measurements are performed in 1×10^{-4} M PAL, pH range is 0.3 – 12.0)

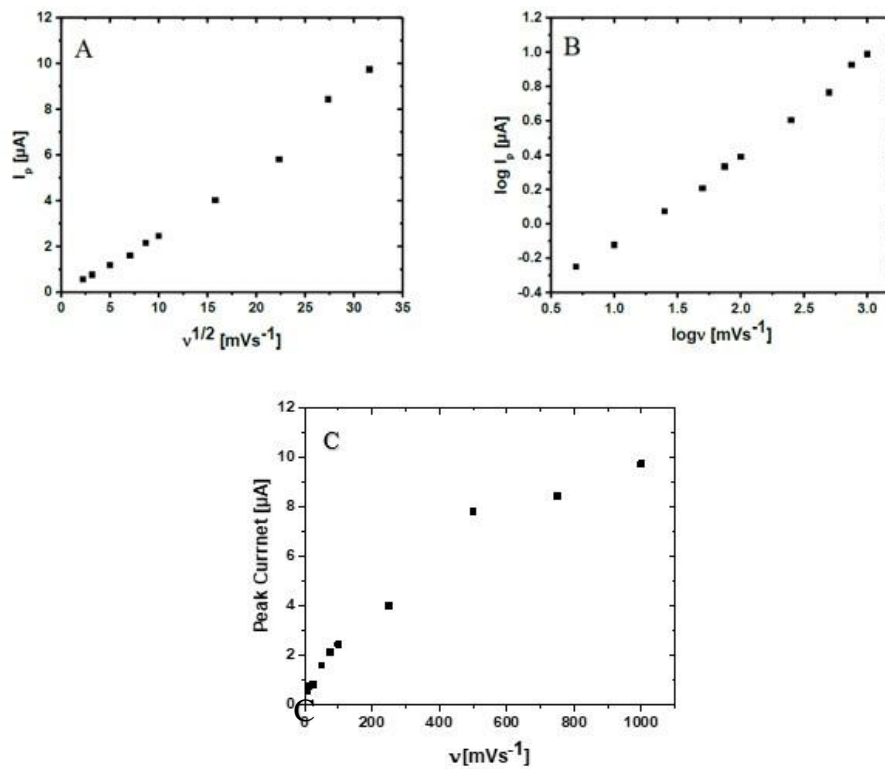


Figure 4. The plots of A) I_p versus $v^{1/2}$, B) $\log I_p$ versus $\log v$, and C) I_p versus v in pH 8 PBS on GCE (The measurements are performed in 1×10^{-4} M PAL)

The calculated slope value of the $\log I_p$ versus $\log v$ equation was found to be close to the theoretical value of 0.5, indicating that the oxidation process of PAL is diffusion-controlled. Additionally, the non-linear response of I_p versus v (Figure 4C) confirmed the diffusion-controlled process. Furthermore, the slope value of the E_p versus $\log v$ equation $= \frac{2.3RT}{2(1-\alpha)nF}$ formula was used to calculate the number of transferred electrons for PAL in pH 8 PBS on GCE. When the necessary calculations were made, n was found to be approximately 2. The parameters in the formula above are:

R: Universal gas constant

T: Absolute temperature

α : Transfer coefficient (If it is an irreversible oxidation reaction, it is calculated as 0.5)

n : Number of electrons

F: Faraday constant

Evaluation of Possible Oxidation Mechanism

CV is a valuable technique that enlightens the electrooxidation behavior of electroactive compounds. In order to elucidate the oxidation mechanism of PAL, molecules with similar structures to PAL, risperidone (RIS), droperidol (DRO), haloperidol (HAL), and benperidol (BEN) were selected (Figure 5). The oxidation peaks of each molecule were examined on bare GCE in three different electrolyte media (pH 4.7 ABS, pH 8 PBS, and pH 9 BRB) by the CV method (Figure 6). As it was given in effect of scan rate section, the number of transferred electrons for PAL was found to be 2. Additionally, the results in effect of pH section indicated that equal numbers of electrons and protons are involved in the oxidation process of PAL. Hence, it is shown that PAL's oxidation reaction is a two-electron and two-proton process. As it was reported in a study by Arvand et al. [15], the oxidation of RIS occurs via nitrogen in the piperidine ring in its structure. This piperidine ring is the mutual structure of PAL, DRO, HAL, and BEN. Therefore, it can be suggested that the oxidation of PAL occurs at its piperidine ring (Figure 7). This suggestion is supported by the fact that the oxidation peaks in Figure 6 are located at approximately the same potential.

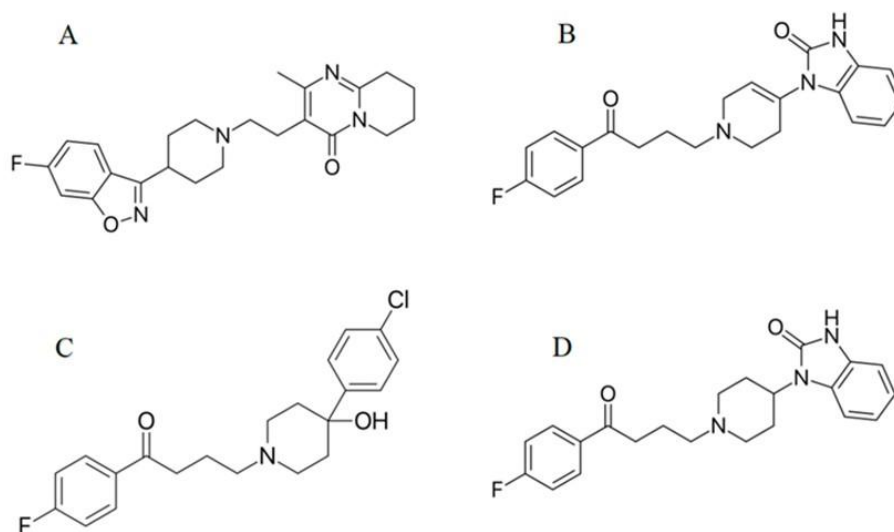


Figure 5. Chemical structures of A) RIS, B) DRO, C) HAL, and D) BEN

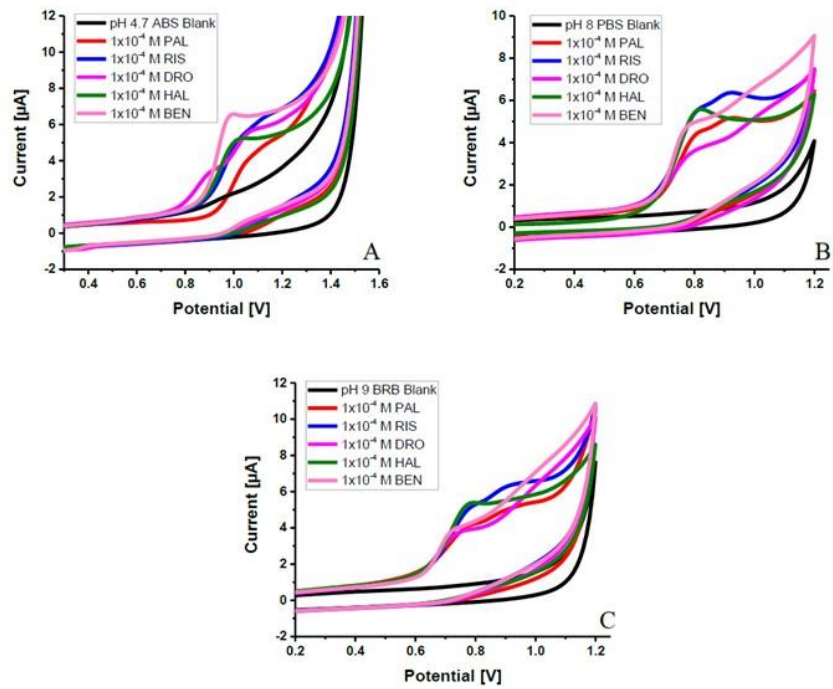


Figure 6. Cyclic voltammograms of 1x10⁻⁴ M PAL, RIS, DRO, HAL, and BEN in A) pH 4.7 ABS, B) pH 8 PBS, and C) pH 9 BRB on GCE

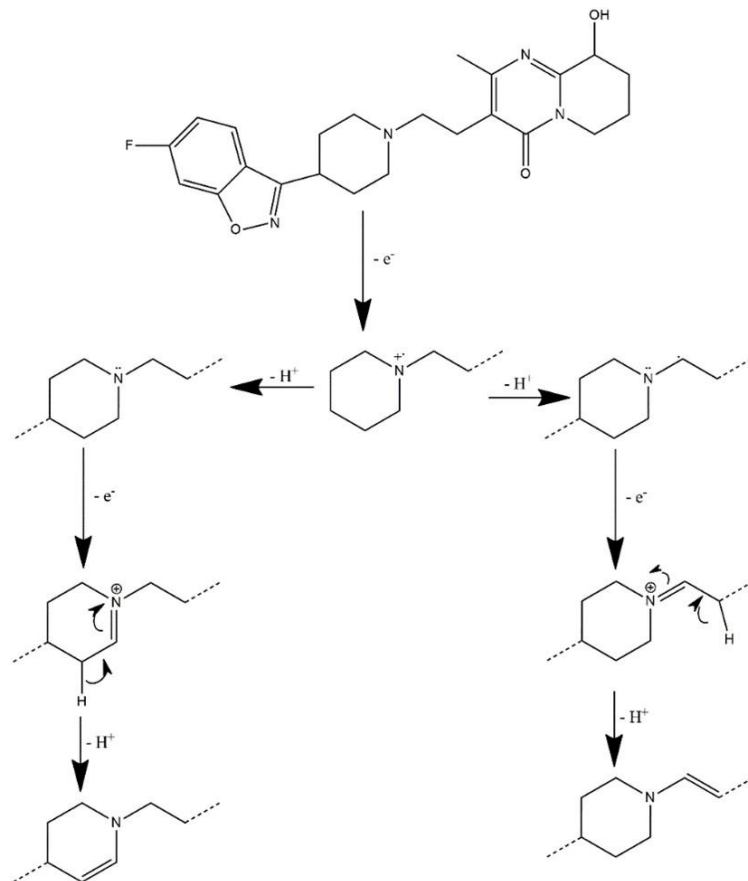


Figure 7. Possible oxidation mechanism of PAL

PAL Determination on Bare GCE

Determination of PAL on bare GCE was assessed using the DPV technique in pH 8 PBS. The obtained I_p values were plotted against varying concentrations of PAL to create the calibration curve. Bare GCE gave a linear response for PAL determination in a wide concentration range between 1×10^{-6} M and 1×10^{-4} M (Figure 8A). The related regression equation was found as $I_p (\mu A) = 77.744 \times 10^3 (\mu A/M) \times C (M) + 0.394$ ($r = 0.999$). The obtained DPV voltammograms for each PAL concentration are shown in Figure 8B. The formulas below, which are given in ICH guidelines, were used to calculate LOD and LOQ as 2.410×10^{-7} M and 8.033×10^{-7} M, respectively [16]. The other regression data are given in Table 1. Table 2 overviews the other studies performed for PAL analysis in the literature.

$$\text{LOD} = 3 \times \text{standard deviation/slope}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{standard deviation/slope}$$

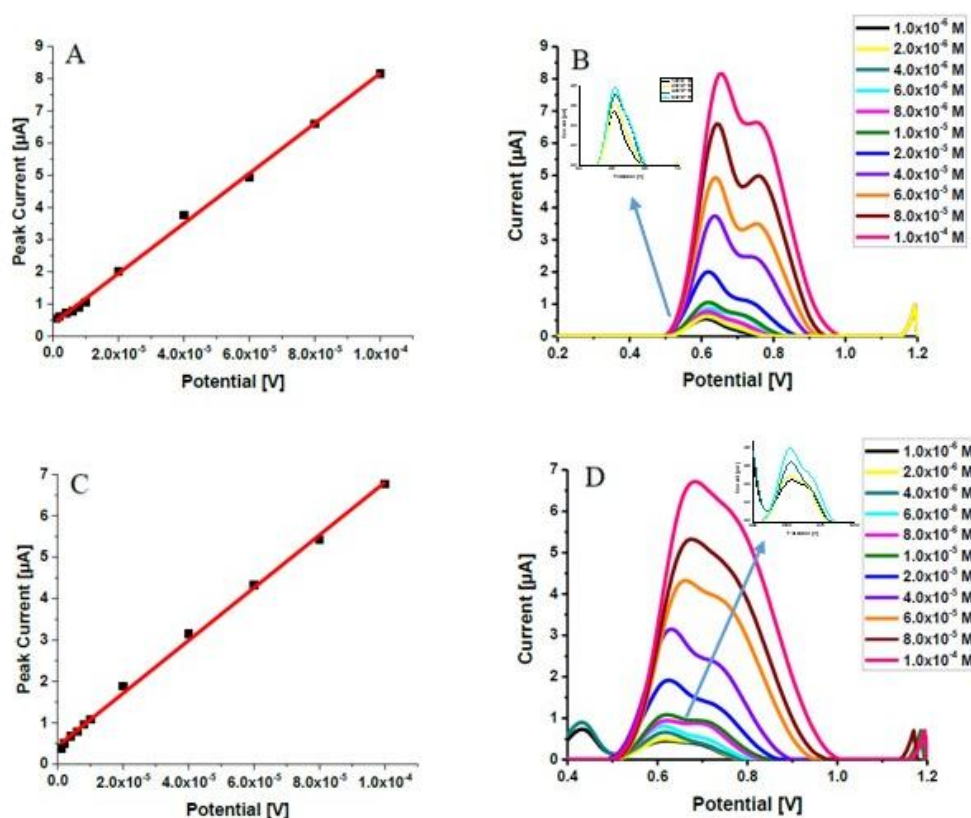


Figure 8. Calibration curves of PAL determination on GCE A) in pH 8 PBS; C) in commercial sample of human serum; DPV voltammograms of various PAL concentrations B) in pH 8 PBS; D) in commercial human serum sample

Analytical Performance in the Biological Media

The next stage in the analytical performance examination is to assess the determination of PAL in biological media. For this purpose, PAL was determined in the sample of commercial human serum that was prepared based on the procedure described in preparation procedure of commercial human serum sample section on GCE using the DPV technique. The linear range was obtained between 1×10^{-6} M and 1×10^{-4} M as in the standard solution with the regression equation of $I_p (\mu A) = 63.730 \times 10^3 (\mu A/M) \times C (M) + 0.438$ ($r = 0.999$) (Figure 8C). Associated DPV voltammograms for PAL determination are displayed in Figure 8D. The LOD and LOQ values were found to be 2.94×10^{-7} M and 9.799×10^{-7} M, respectively. The regression data parameters are given in Table 1.

Following this, the recovery assay was realized by spiking two known concentrations of standard PAL solution to the sample of commercial human serum. The acquired average recovery% and RSD% values in Table 3 confirmed the accuracy and feasibility in biological samples.

Table 1. Regression data of the calibration line for PAL on GCE in standard solution and commercial human serum sample

	Standard solution	Commercial human serum sample
Linear range (M)	$1.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-4}$
Slope ($\mu\text{A/M}$)	77.744×10^3	63.730×10^3
Standard error of slope ($\mu\text{A/M}$)	1.107×10^3	0.933×10^3
Intercept (μA)	0.394	0.438
Standard error of intercept (μA)	0.049	0.042
Correlation coefficient (r)	0.999	0.999
LOD (M)	2.410×10^{-7}	2.940×10^{-7}
LOQ (M)	8.033×10^{-7}	9.799×10^{-7}
Repeatability of peak current (RSD%)*	0.682	1.779
Reproducibility of peak current (RSD%)*	1.771	1.994
Repeatability of peak potential (RSD%)*	0.072	0.081
Reproducibility of peak potential (RSD%)*	0.075	0.143

* Each value is the mean of five experiments.

Table 2. Comparison of analytical methods developed for PAL determination

Method	Linear Range	LOD	Sample	Recovery (%)	Ref.
HPTLC	100 – 600 ng/ml	NA	Tablet	98.77 – 101.39	[4]
LC-MS/MS	25 – 500 ng/ml	25 ng/ml	NA	NA	[17]
UPLC	0.00005 – 2.25 $\mu\text{g/ml}$	0.00001 $\mu\text{g/ml}$	Pharmaceutical injection	87.6 – 106.3	[5]
RP-HPLC	20 – 120 $\mu\text{g/ml}$	1.25 $\mu\text{g/ml}$	Tablet	99.80	[18]
Spectrophotometry	40 – 80 $\mu\text{g/ml}$	0.85 $\mu\text{g/ml}$	Tablet	101.84 – 102.76	[19]
UHPLC-MS/MS	1 – 1000 ng/ml	1 ng/ml	Beagle dog plasma	NA	[3]
UFLC	2 – 100 $\mu\text{g/ml}$	0.5 $\mu\text{g/ml}$	Tablet	98.22 – 102.96	[20]
LC-MS/MS	2.5 – 160 ng/ml	0.25 ng/ml	Serum	NA	[13]
HPLC	0.125 – 100 $\mu\text{g/ml}$	0.0132 $\mu\text{g/ml}$	Tablet	98 – 100	[8]
HPTLC	20 – 140 ng/band	1.288 ng/band	Tablet	NA	[11]
LC-MS/MS	1 – 2000 ng/ml	NA	Plasma, urine	90.4 – 105.1	[12]
Spectrophotometry	2.5 – 70 $\mu\text{g/ml}$	0.316 $\mu\text{g/ml}$	Tablet	98.94	[6]
Electrochemistry	$1.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-4}$ M (0.4 – 40 $\mu\text{g/ml}$)	2.410×10^{-7} M (0.097 $\mu\text{g/ml}$)	Serum	98.90 – 100.23	This work

HPTLC: high-performance thin-layer chromatography, NA: not available, LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC: ultra-performance liquid chromatography, RP-HPLC: reverse phase high performance liquid chromatography, UHPLC-MS/MS: ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, UFLC: ultrafast liquid chromatography

Table 3. Recovery results of commercial human serum samples for PAL on GCE

	Serum Sample 1	Serum Sample 2
Sample concentration (M)	2.00×10^{-5}	4.00×10^{-5}
Spiked amount (M)	4.00×10^{-5}	2.00×10^{-5}
Found amount (M)*	5.89×10^{-5}	5.99×10^{-5}
Confidence interval*	± 1.946	± 1.157
Average recovery%	98.90	100.23
RSD% of recovery	2.00	1.32
Bias%	-1.10	+0.23

* Each value is the mean of five experiments

Interference Effect Assessment

Interference assay evaluates GCE's ability to determine PAL in the presence of substances found in biological fluids (natural or exogenous) without being affected by their signals. For this purpose, the most known possible interfering agents, ascorbic acid, KNO_3 , MgCl_2 , paracetamol, dopamine, Na_2SO_4 , and uric acid, were selected. The recovery% and RSD% values were between 98.32% -101.56% and 0.15% and 1.99%, respectively. The determination performance of GCE and 2×10^{-5} M PAL was investigated in the presence of these compounds at 1-, 10-, and 100-times concentrations. As the obtained recovery% results are examined, PAL could be determined in the presence of ascorbic acid, MgCl_2 , and Na_2SO_4 without any interference effect. On the other hand, an interference effect was observed in the presence of KNO_3 and paracetamol at 100 times and in the presence of dopamine at 10 and 100 times. An interference effect was observed due to the oxidation of uric acid at a very similar potential with PAL in the pH 8 PBS environment.

Conclusion

This work is the first one in the literature to evaluate electrochemical behavior and determination of an antipsychotic drug, PAL, on GCE. Investigation of the electrooxidation characteristics of PAL showed that in pH 8 PBS, PAL has two oxidation peaks located around 0.79 V and 0.92 V, which are not completely separated. As a result of the pH effect investigation, the oxidation peak of PAL shifts towards lower potentials with higher pH values and has the highest value at pH 8 PBS. Additionally, it was found that an equal number of electrons and protons are involved in the PAL oxidation. The effect of scan rate investigation revealed that the number of transferred electrons in the oxidation reaction is 2, and PAL's oxidation process is diffusion-controlled. Furthermore, based on the oxidation behavior of other similarly structured compounds (RIS, DRO, HAL, and BEN), it is suggested that PAL oxidation occurs at the piperidine ring in its structure. Determination of PAL in standard solution has a linear response in the concentration range between 1×10^{-6} M and 1×10^{-4} M. The LOD and LOQ values are 2.41×10^{-7} M and 8.033×10^{-7} M, respectively. The determination of PAL in biological media was assessed in the sample of commercial human serum, and the same linear range as in the standard solution was obtained. Recovery studies confirmed the feasibility of PAL determination in biological media. It was also found that PAL could be determined without any interference effect in the presence of ascorbic acid, MgCl_2 , and Na_2SO_4 .

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: S.I.K., S.A.O.; Design: S.I.K., S.A.O.; Control: S.I.K., S.A.O.; Sources: N.K.B., S.A.O.; Materials: N.K.B., S.A.O.; Data Collection and/or Processing: S.I.K., E.O.; Analysis and/or Interpretation: S.I.K., E.O.; Literature Review: S.I.K., E.O.; Manuscript Writing: S.I.K., E.O.; Critical Review: S.I.K., N.K.B., S.A.O.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

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

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

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

REFERENCES

1. Kasper, S., Papadimitriou, G.N. (2009). Schizophrenia: Vol. 2nd ed (Issue Vol. 17). Florida: CRC Press.
2. Korell, J., Green, B., Remmerie, B., Vermeulen, A. (2017). Determination of plasma concentration reference ranges for risperidone and paliperidone. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 6(9), 589-595. [\[CrossRef\]](#)
3. Chen, H., Zhao, L., Li, G., Leng, D., Ma, P., Tong, L., Zhang, T. (2014). Development and validation of a rapid and sensitive UHPLC-MS/MS method for the determination of paliperidone in beagle dog plasma. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(5), 286-292. [\[CrossRef\]](#)

4. Patel, R.B., Patel, B.G., Patel, M.R., Bhatt, K.K. (2010). HPTLC method development and validation: Quantification of paliperidone in formulations and in vitro release study. *Analytical Methods*, 2(5), 525-531-531. [\[CrossRef\]](#)
5. Bindu, K.H., Dhekale, N., Suryanarayana, M.V., Anjaneyulu, Y. (2012). A validated stability indicating uplc method for simultaneous determination of assay, related substances, and degradation products of paliperidone palmitate active pharmaceutical ingredient and its pharmaceutical injection forms. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35(4), 533-546. [\[CrossRef\]](#)
6. Dash, S.K., Acharjya, S.K., Das, P.S., Kumar, N.K., Patra, C.N. (2022). Development and validation of a first-derivative spectrophotometric method for the estimation of an antipsychotic drug in pharmaceutical formulations and forced degradation studies. *Journal of Applied Spectroscopy*, 88(6), 1276-1283. [\[CrossRef\]](#)
7. Citrome, L. (2012). Oral paliperidone extended-release: Chemistry, pharmacodynamics, pharmacokinetics and metabolism, clinical efficacy, safety and tolerability. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 8(7), 873-888. [\[CrossRef\]](#)
8. Atila Karaca, S., Yeniceli Uğur, D. (2018). Chemometrically assisted optimization and validation of a new HPLC method for the determination of paliperidone in pharmaceuticals. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 41(3), 129-134. [\[CrossRef\]](#)
9. Yamagishi, Y., Inokuchi, G., Hoshioka, Y., Nagasawa, S., Iwase, H., Ogra, Y. (2023). Identification of postmortem paliperidone metabolite in human blood by LC-Q-Orbitrap-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 47(6), 517-522. [\[CrossRef\]](#)
10. Jadhav, S.A., Landge, S.B., Choudhari, P.M., Solanki, P.V., Bembalkar, S.R., Mathad, V.T. (2011). Stress degradation behavior of paliperidone, an antipsychotic drug, and development of suitable stability-indicating RP-LC Method. *Chromatography Research International*, 2011(1), 256812.
11. Shirode, A., Garade, C., Kadam, V. (2018). Development and validation of HPTLC method for quantitative estimation of paliperidone. *Indian Drugs*, 55(9), 34-40.
12. De Meulder, M., Remmerie, B.M.M., de Vries, R., Sips, L.L.A., Boom, S., Hooijschuur, E.W.J., van de Merbel, N.C., Timmerman, P.M.M.B.L. (2008). Validated LC-MS/MS methods for the determination of risperidone and the enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in human plasma and urine. *Journal of Chromatography B*, 870(1), 8-16. [\[CrossRef\]](#)
13. Ruan, C.J., Zhou, M., Guo, G.X., Li, W.B., Guo, W., Wang, C.Y., de Leon, J. (2018). Quantitative determination of risperidone, paliperidone and olanzapine in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with on-line solid-phase extraction. *Biomedical Chromatography*, 32(7), e4209. [\[CrossRef\]](#)
14. Brett, C.M.A., Oliveira Brett, A.M. (1993). *Electrochemistry: Principles, methods, and applications*. Oxford University Press.
15. Arvand, M., Ardaki, M.S., Zanjanchi, M.A. (2015). A new sensing platform based on electrospun copper oxide/ionic liquid nanocomposite for selective determination of risperidone. *RSC Advances*, 5(51), 40578-40587. [\[CrossRef\]](#)
16. European Medicines Agency. (1995). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. International Conference on Harmonisation (ICH) Guideline, ICH Topic Q2 (R1).
17. Bocato, M.Z., Simões, R.A., Calixto, L.A., de Gaitani, C.M., Pupo, M.T., De Oliveira, A.R.M. (2012). Solid phase microextraction and LC-MS/MS for the determination of paliperidone after stereoselective fungal biotransformation of risperidone. *Analytica Chimica Acta*, 742, 80-89. [\[CrossRef\]](#)
18. Umamaheswar, K., Ramu, G., Rambabu, C. (2012). A reverse phase hplc method development and validation for the determination of paliperidone in pure and dosage forms. *Chemical Science Transactions*, 2(1), 41-46.
19. Mendez, A., Cassol, J., Camargo, V., Malesuik, M., Garcia, C. (2013). Quantitative determination of paliperidone in OROS® tablets by derivative spectrophotometric method-application in extraction and comparison to HPLC. *Current Analytical Chemistry*, 10(1), 158-165. [\[CrossRef\]](#)
20. Suman Panda, S., Beg, S., Ravi, K., Varaha, V., Priyadarshini, S. (2015). Quality-By-Design compliant ultrafast liquid chromatographic method for determination of paliperidone in extended release tablet dosage form. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine*, 7(4), 4. [\[CrossRef\]](#)



SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND CHOLINESTERASE INHIBITORY EFFECTS OF IBUPROFEN-BASED SPIROTHIAZOLIDINONES

İBUPROFEN TÜREVİ SPIROTHIAZOLIDİNONLARIN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE KOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR ETKİLERİ

Çağla Begüm APAYDIN^{1*} , Gozde HASBAL CELİKOK² , Tugba YILMAZ OZDEN² 

¹Istanbul University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Istanbul, Türkiye

²Istanbul University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Istanbul, Türkiye

ABSTRACT

Objective: A novel class of spirothiazolidinone derivatives were designed, synthesized, and assessed as possible acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) inhibitors for Alzheimer's disease therapy.

Material and Method: In this study, novel spirocyclic compounds were synthesized by one-pot reaction. IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, LC-MS and elemental analysis techniques have all been used to clarify the chemical structures of the compounds. AChE and BuChE inhibitory effects of compounds (4a-e and 5a-e) were assayed according to Ellman's method using galantamine as reference.

Result and Discussion: According to the inhibition data, compound 4e demonstrated the most promising activity against AChE, with an IC₅₀ value of 39.53±1.94 μM, while compound 4b exhibited the most potential against BuChE, with an IC₅₀ value of 95.97±1.79 μM.

Keywords: Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, ibuprofen, spirothiazolidinone, synthesis

ÖZ

Amaç: Alzheimer hastalığına karşı potansiyel asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BuChE) inhibitörleri olarak bir seri yeni spirotiyazolidinon türevi tasarlanmış, sentezlenmiş ve inhibisyon etkileri değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmadan kazanılan yeni spiro bileşikler tek kap yöntemi ile sentez edilmiştir. Bileşiklerin kimyasal yapılarını aydınlatmak için IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, LC-MS ve elementel analiz yöntemleri kullanılmıştır. Bileşiklerin (4a-e ve 5a-e), AChE ve BuChE enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri galantamin referans olarak kullanılarak Ellman yöntemine göre analiz edilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: İnhibisyon sonuçlarına göre, en umut verici bileşik AChE'ye karşı IC₅₀ değeri 39.53±1.94 μM olan 4e ve BuChE'ye karşı IC₅₀ değeri 95.97±1.79 μM olan 4b bileşikleri olarak kaydedilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Asetilkolinesteraz, butirilkolinesteraz, ibuprofen, sentez, spirotiyazolidinon

INTRODUCTION

* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Çağla Begüm Apaydın
e-mail / e-posta: cagla.apaydin@istanbul.edu.tr, Tel. / Phone: +902124400000/13462

Submitted / Gönderilme : 30.05.2024

Accepted / Kabul : 17.09.2024

Published / Yayınlanma : 20.01.2025

A type of dementia known as Alzheimer's disease gradually impairs all cognitive functions, particularly memory. It is identified microscopically by aberrant protein accumulation in the brain [1]. Cholinergic neurotransmission is crucial for regulating cognitive functions, particularly in learning and memory [2]. Cholinesterases (ChE), namely acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) are involved in cholinergic transmission. AChE and BuChE inhibitors indirectly enhance cholinergic transmission by inhibiting the enzyme that hydrolyzes acetylcholine (ACh). Tacrine, the first-generation AChE inhibitor, was withdrawn from use due to its hepatotoxic effects. Donepezil, galantamine and rivastigmine (as shown in Figure 1), which were developed later, and currently approved by the FDA for Alzheimer's disease, are frequently used in the treatment [3].

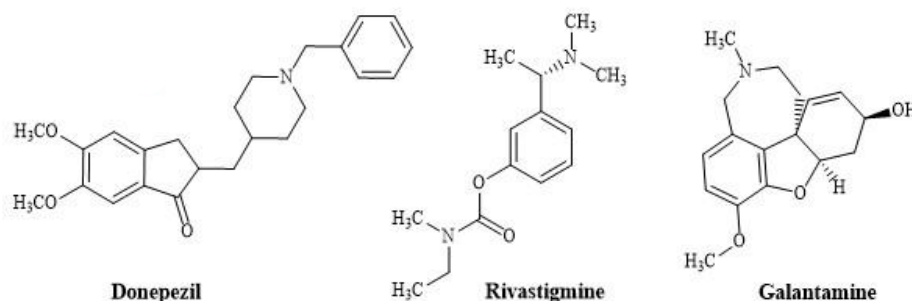


Figure 1. The structures of ChE inhibitors used for the treatment of AD

The chiral 2-arylpropionic acid (2-APA) derivative, ibuprofen, also known as (\pm) -(R,S)- α -methyl-4-(2-methylpropyl)benzeneacetic acid, is a well-known and often used nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) (as shown in Figure 2) [4]. The first discovery of the anti-inflammatory effects of ibuprofen was made in 1961 by Dr. Stewart Adams and the drug was introduced on the market in 1969 in the UK for the treatment of rheumatic arthritis [5].

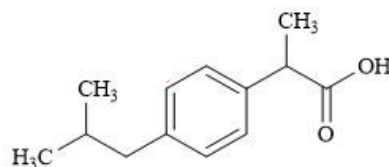


Figure 2. The structure of ibuprofen

Long-term usage of NSAIDs reportedly lowers the risk of Alzheimer's disease [6]. Its effects may be through decreasing the concentrations of amyloid beta peptide ($A\beta$) (1-42), which is the amyloidogenic form, and it may be associated with behavioral changes observed in AD. *In vitro* studies showed that mouse treated with ibuprofen had a 90% reduction in $A\beta$ plaque and ibuprofen treatment in mouse (regardless of cyclooxygenase-2 inhibition) reduced oxidative stress and plaque load without improving cognitive function by preventing inhibition of the NADPH oxidase 2 complex [7].

4-Thiazolidinones are active compounds that play a crucial role in pharmacological effects. There are numerous studies demonstrating that compounds containing the 4-thiazolidinone ring have antituberculosis [8], anticancer [9,10], anti-inflammatory [11], antidiabetic [12], hypnotic [13], and antiviral activities [14]. Additionally, there are studies on the AChE and BuChE inhibition effects of these compounds are available [15,16].

As previously noted, there is existing literature suggesting that NSAIDs like ibuprofen may help reduce the risk of Alzheimer's disease [6]. The spirothiazolidinone core also has significant potential in

the development of biologically important compounds [17,18]. Encouraged by the above data, it was anticipated that a combination of ibuprofen and spirothiazolidinone structures in one molecule could be interesting to the development of new agents that inhibit cholinesterase activity. In this study, novel 2-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanehydrazide derivatives incorporating a spirothiazolidinone ring were designed, synthesized and assessed for their AChE and BuChE inhibitor effects *in vitro*.

MATERIAL AND METHOD

Chemistry

Chemicals and Instruments

All of the chemicals used were purchased from Aldrich without subsequent purification. The Shimadzu IR Affinity-1 FTIR spectrometer was used to record infrared (IR) spectra. ^1H and ^{13}C NMR (APT) spectra were acquired in CDCl_3 using a "Bruker 500 MHz" instrument. Chemical shifts are reported as δ (ppm), while coupling constants (J) are provided in hertz (Hz). TMS used as the internal standard. Agilent 1260 Infinity II LC/MS mass spectrometer was used to record the mass spectra with electrospray ionization. The Buchi B-540 melting point equipment was used to determine melting points. Elemental analyzer (Thermo Finnigan Flash EA 1112) was used for microanalyses. (sp: spirodecan)

Methyl 2-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoate (2)

A solution containing sulfuric acid (98%) (0.1 mol) and racemic acid (0.01 mol) in 50 ml of methanol was refluxed over night. The mixture was neutralized with sodium bicarbonate solution (0.01 mol), then extracted with chloroform, and finally dried over anhydrous sodium sulfate. A yellowish oil was obtained by evaporating the solvents in vacuum (CAS number: 61566-34-5) [19].

2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propanehydrazide (3)

A mixture of 2 (0.1 mol), $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (98%, 0.2 mol), and ethanol (50 ml) was heated under reflux for 8 hours. The resulting solid was filtered and utilized without additional purification (CAS number: 127222-69-9) [20].

General procedure for the synthesis of 2-[4-(2-methylpropyl)phenyl]-*N*-[2,8-(non)substituted-3-oxo-1-thia-4-azaspiro[4.5]decan-4-yl]propanamides (4, 5)

Using a Dean–Stark water separator, a mixture containing 3 (0.0025 mol), a suitable cyclohexanone (0.0025 mol), and either mercaptoacetic acid or 2-mercaptopropionic acid (0.01 mol) in dry toluene was refluxed for 6–8 hours. In vacuo, extra toluene was evaporated. The solid separated was collected, washed with sodium bicarbonate solution and water. After drying, the solid crystallized again from ethanol.

2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]-*N*-(3-oxo-1-thia-4-azaspiro[4.5]decan-4-yl) propanamide (4a)

White crystals. mp: 80-84 °C. yield 80%. IR(KBr): ν_{max} 3417 (NH), 1716 (CO), 1676 (NHCO). ^1H -NMR ($\text{CDCl}_3/500$ MHz): 7.29 (3H, d, $J = 7.8$ Hz, phenyl $\text{C}_{2,6\text{-H}}$ and NH), 7.16 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, phenyl $\text{C}_{3,5\text{-H}}$), 3.72 (1H, q, $J = 7.1$ Hz, COCH), 3.54, 3.48 (2H, 2d, $J = 15.9$ Hz, COCH_2), 2.48 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 1.89-1.67; 1.60-1.43 (14H, m, sp-H, CH and CH_3), 0.91 (6H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3). ^{13}C -NMR ($\text{CDCl}_3/125$ MHz): 174.1, 168.8, 141.1, 137.7, 129.7, 127.4, 73.1, 45.0, 44.9, 37.3, 37.2, 30.1, 28.5, 24.4, 23.1, 23.0, 22.3, 18.2. LC/MS (m/z): $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ requires 374.54 found $[\text{M} + \text{H}]^+$: 375.2. Anal. calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (374.54) C= 67.34, H= 8.07, N= 7.48. Found C= 67.02, H= 8.03, N= 7.46.

2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]-*N*-(8-methyl-3-oxo-1-thia-4-azaspiro[4.5]decan-4-yl) propanamide (4b)

White powder. mp: 88-90 °C. yield 76%. IR(KBr): ν_{max} 3415 (NH), 1726 (CO), 1678 (NHCO). ^1H -NMR (500 MHz): 7.30 (1H, s, NH), 7.28 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, phenyl $\text{C}_{2,6\text{-H}}$), 7.15 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, phenyl $\text{C}_{3,5\text{-H}}$), 3.72 (1H, q, $J = 7.1$ Hz, COCH), 3.55, 3.48 (2H, 2d, $J = 15.9$ Hz, COCH_2), 2.48 (2H, d,

$J=7.2$ Hz, CH₂), 1.88-1.72; 1.64-1.55; 1.27-1.09 (13H, m, sp-H, CH and CH₃), 0.91 (6H, d, $J=7.0$ Hz, CH₃), 0.88 (3H, d, $J=7.0$ Hz, sp-CH₃). ¹³C-NMR(125 MHz): 174.1, 168.9, 141.1, 137.7, 129.7, 127.4, 72.9, 44.9, 44.9, 37.0, 36.9, 31.5, 31.4, 31.1, 30.1, 28.5, 22.3, 22.2, 21.7, 18.1. LC/MS (m/z): C₂₂H₃₂N₂O₂S requires 388.56 found [M + H]⁺: 389.2. Anal. calcd. for C₂₂H₃₂N₂O₂S (388.57) C= 68.00, H= 8.30, N= 7.21. Found C= 68.09, H= 8.25, N= 7.22.

2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]-N-(8-ethyl-3-oxo-1-thia-4-azaspiro[4.5]decan-4-yl) propanamide (4c)

White powder. mp: 98-101 °C. yield 81%. IR(KBr): ν_{\max} 3410 (NH), 1720 (CO), 1676 (NHCO). ¹H-NMR (500 MHz): 7.29 (2H, d, $J=8.1$ Hz, phenyl C_{2,6-H}), 7.27 (1H, s, NH), 7.16 (2H, d, $J=8.1$ Hz, phenyl C_{3,5-H}), 3.72 (1H, q, $J=7.1$ Hz, COCH), 3.55, 3.48 (2H, 2d, $J=15.9$ Hz, COCH₂), 2.48 (2H, d, $J=7.2$ Hz, CH₂), 1.89-1.69; 1.60-1.53; 1.23-1.10 (15H, m, sp-H, CH, CH₂ and CH₃), 0.91 (6H, d, $J=7.0$ Hz, CH₃), 0.88 (3H, t, $J=7.0$ Hz, CH₂CH₃). ¹³C-NMR(125 MHz): 174.0, 168.8, 141.1, 137.7, 129.7, 127.4, 73.2, 45.0, 44.9, 37.7, 37.0, 36.9, 30.1, 29.2, 28.5, 22.3, 18.1, 11.4. LC/MS (m/z): C₂₃H₃₄N₂O₂S requires 402.59 found [M + H]⁺: 403.1. Anal. calcd. for C₂₃H₃₄N₂O₂S (402.59) C= 68.62, H= 8.51, N= 6.96. Found C= 68.98, H= 8.32, N= 6.90.

2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]-N-(8-propyl-3-oxo-1-thia-4-azaspiro[4.5]decan-4-yl) propanamide (4d)

White crystals. mp: 89-94 °C. yield 85%. IR(KBr): ν_{\max} 3433 (NH), 1705 (CO), 1678 (NHCO). ¹H-NMR (500 MHz): 7.28 (2H, d, $J=8.1$ Hz, phenyl C_{2,6-H}), 7.26 (1H, s, NH), 7.15 (2H, d, $J=8.1$ Hz, phenyl C_{3,5-H}), 3.71 (1H, q, $J=7.1$ Hz, COCH), 3.54, 3.48 (2H, 2d, $J=15.9$ Hz, COCH₂), 2.47 (2H, d, $J=7.2$ Hz, CH₂), 1.88-1.67; 1.60-1.55; 1.30-1.24; 1.19-1.10 (17H, m, sp-H, CH, CH₂ and CH₃), 0.92 (6H, d, $J=7.0$ Hz, CH₃), 0.87 (3H, t, $J=7.0$ Hz, CH₂CH₃). ¹³C-NMR (125 MHz): 174.0, 168.8, 141.1, 137.7, 129.7, 127.4, 73.2, 45.0, 44.9, 38.6, 37.0, 36.9, 35.7, 30.5, 30.1, 29.7, 29.5, 29.4, 28.5, 26.7, 22.3, 20.7, 20.0, 18.2, 14.2. LC/MS (m/z): C₂₄H₃₆N₂O₂S requires 416.61 found [M + H]⁺: 417.2. Anal. calcd. for C₂₄H₃₆N₂O₂S (416.62) C= 69.19, H= 8.71, N= 6.72. Found C= 69.38, H= 8.50, N= 6.70.

2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]-N-(8-tert-butyl-3-oxo-1-thia-4-azaspiro[4.5]decan-4-yl) propanamide (4e)

White powder. mp: 178-179 °C. yield 75%. IR(KBr): ν_{\max} 3261 (NH), 1716 (CO), 1685 (NHCO). ¹H-NMR (500 MHz): 7.29 (2H, d, $J=8.1$ Hz, phenyl C_{2,6-H}), 7.23 (1H, s, NH), 7.16 (2H, d, $J=8.1$ Hz, phenyl C_{3,5-H}), 3.71 (1H, q, $J=7.1$ Hz, COCH), 3.54, 3.48 (2H, 2d, $J=15.9$ Hz, COCH₂), 2.48 (2H, d, $J=7.2$ Hz, CH₂), 1.90-1.71; 1.59-1.54; 1.27-1.24 (13H, m, sp-H, CH and CH₃), 0.91 (6H, d, $J=7.0$ Hz, CH₃), 0.84 (9H, s, *tert*-butyl CH₃). ¹³C-NMR (125 MHz): 174.1, 168.8, 141.1, 137.7, 129.7, 127.4, 73.1, 46.5, 45.0, 44.9, 37.4, 37.3, 32.2, 30.1, 28.5, 27.4, 24.0, 23.9, 22.3, 18.2. LC/MS (m/z): C₂₅H₃₈N₂O₂S requires 430.64 found [M + H]⁺: 431.2. Anal. calcd. for C₂₅H₃₈N₂O₂S (430.651) C= 69.73, H= 8.89, N= 6.51. Found C= 70.00, H= 8.92, N= 6.50.

2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]-N-(2-methyl-3-oxo-1-thia-4-azaspiro[4.5]decan-4-yl) propanamide (5a)

White powder. mp: 164-166 °C. yield 78%; IR(KBr): ν_{\max} 3259 (NH), 1716 (CO), 1681 (NHCO). ¹H-NMR (500 MHz): 7.29 (2H, d, $J=8.1$ Hz, phenyl C_{2,6-H}), 7.28 (1H, s, NH), 7.16 (2H, d, $J=8.1$ Hz, phenyl C_{3,5-H}), 3.81, 3.77 (1H, 2q, $J=7.1$ Hz, sp-COCH), 3.72 (1H, q, $J=7.1$ Hz, COCH), 2.48 (2H, d, $J=7.2$ Hz, CH₂), 1.89-1.68; 1.61-1.42 (17H, m, sp-H, CH, CH₃ and sp²-CH₃), 0.91 (6H, d, $J=7.0$ Hz, CH₃). ¹³C-NMR(125 MHz): 174.1, 171.6, 141.1, 137.6, 129.7, 127.4, 71.5, 45.0, 38.2, 37.5, 37.4, 37.3, 37.1, 30.1, 24.4, 23.4, 23.3, 23.0, 22.9, 22.3, 19.9, 19.4, 18.3, 18.2. LC/MS (m/z): C₂₂H₃₂N₂O₂S requires 388.56 found [M + H]⁺: 389.2. Anal. calcd. for C₂₂H₃₂N₂O₂S (388.57) C= 68.00, H= 8.30, N= 7.21. Found C= 67.82, H= 8.21, N= 7.20.

2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]-N-(2,8-dimethyl-3-oxo-1-thia-4-azaspiro[4.5]decan-4-yl) propanamide (5b)

White powder. mp: 198-203 °C. yield 80%. IR(KBr): ν_{\max} 3259 (NH), 1714 (CO), 1681 (NHCO). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz): 7.29 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, phenyl $\text{C}_{2,6\text{-H}}$), 7.21, 7.18 (1H, 2s, NH), 7.16 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, phenyl $\text{C}_{3,5\text{-H}}$), 3.79, 3.75 (1H, 2q, $J = 7.1$ Hz, sp-COCH), 3.72 (1H, q, $J = 7.1$ Hz, COCH), 2.48 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 1.89-1.68; 1.61-1.42 (16H, m, sp-H, CH, CH_3 and $\text{sp}_2\text{-CH}_3$), 0.91 (6H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3), 0.88 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, $\text{sp}_8\text{-CH}_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz): 174.0, 171.7, 141.0, 137.6, 129.7, 127.4, 71.4, 45.0, 44.9, 37.9, 37.5, 37.3, 37.1, 36.8, 31.9, 31.7, 31.4, 31.3, 31.1, 30.1, 22.3, 21.7, 19.9, 19.4, 18.2, 18.1. LC/MS (m/z): $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ requires 402.59 found $[\text{M} + \text{H}]^+$: 403.2. Anal. calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (402.597) C= 68.62, H= 8.51, N= 6.96. Found C= 68.88, H= 8.68, N= 6.90.

2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]-N-(2-methyl-8-ethyl-3-oxo-1-thia-4-azaspiro[4.5]decan-4-yl)propanamide (5c)

White crystals. mp: 195-197 °C; yield 86%. IR(KBr): ν_{\max} 3257 (NH), 1716 (CO), 1681 (NHCO). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz): 7.29 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, phenyl $\text{C}_{2,6\text{-H}}$), 7.16 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, phenyl $\text{C}_{3,5\text{-H}}$), 7.13 (1H, s, NH), 3.79, 3.75 (1H, 2q, $J = 7.1$ Hz, sp-COCH), 3.72 (1H, q, $J = 7.1$ Hz, COCH), 2.48 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 1.89-1.52; 1.23-1.10 (18H, m, sp-H, CH, CH_3 and $\text{sp}_2\text{-CH}_3$), 0.91 (6H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3), 0.84 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, $\text{sp}_8\text{-CH}_2\text{CH}_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz): 174.0, 171.6, 141.1, 137.7, 129.7, 127.4, 71.7, 45.0, 44.9, 37.9, 37.7, 37.5, 37.3, 37.1, 36.8, 30.1, 29.5, 29.3, 29.0, 28.9, 22.3, 19.9, 19.4, 18.2, 18.1, 11.4. LC/MS (m/z): $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ requires 416.61 found $[\text{M} + \text{H}]^+$: 417.2. Anal. calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (416.62) C= 69.19, H= 8.71, N= 6.72. Found C= 69.30, H= 8.64, N= 6.73.

2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]-N-(2-methyl-8-propyl-3-oxo-1-thia-4-azaspiro[4.5]decan-4-yl)propanamide (5d)

White crystals. mp: 193-196 °C. yield 80%. IR(KBr): ν_{\max} 3257 (NH), 1712 (CO), 1681 (NHCO). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz): 7.30 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, phenyl $\text{C}_{2,6\text{-H}}$), 7.17 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, phenyl $\text{C}_{3,5\text{-H}}$), 7.10, 7.08 (1H, 2s, NH), 3.79, 3.75 (1H, 2q, $J = 7.1$ Hz, sp-COCH), 3.71 (1H, q, $J = 7.1$ Hz, COCH), 2.48 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 1.89-1.52; 1.31-0.99 (20H, m, sp-H, CH, CH_2 , CH_3 and $\text{sp}_2\text{-CH}_3$), 0.91 (6H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3), 0.88 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, $\text{sp}_8\text{-CH}_2\text{CH}_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz): 174.0, 171.6, 141.1, 137.6, 129.7, 127.4, 71.7, 45.0, 44.9, 38.6, 37.9, 37.5, 36.9, 35.7, 30.1, 29.8, 29.7, 29.4, 29.3, 22.3, 20.0, 19.9, 18.2, 14.2. LC/MS (m/z): $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ requires 430.64 found $[\text{M} + \text{H}]^+$: 431.3. Anal. calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (430.65) C= 69.73, H= 8.89, N= 6.51. Found C= 69.78, H= 8.82, N= 6.50.

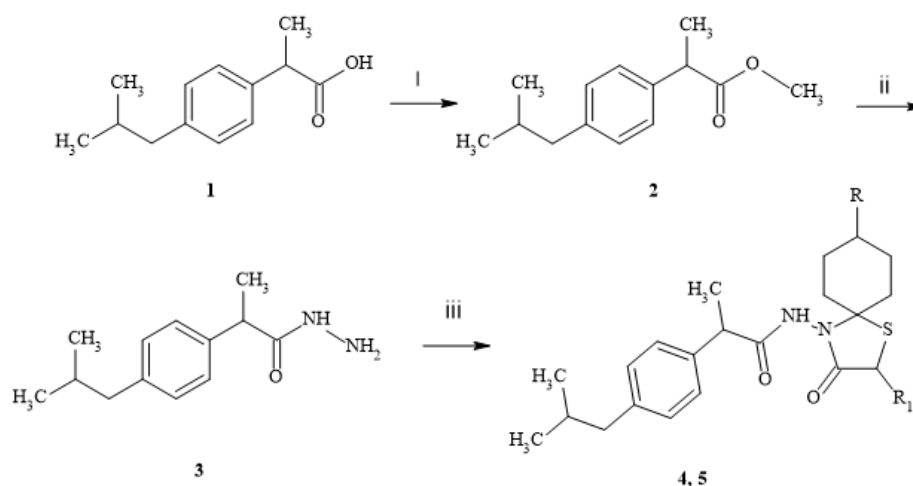
2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]-N-(2-methyl-8-tert-butyl-3-oxo-1-thia-4-azaspiro[4.5]decan-4-yl)propanamide (5e)

White powder. mp: 203-208 °C. yield 83%. IR(KBr): ν_{\max} 3261 (NH), 1716 (CO), 1687 (NHCO). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz): 7.30 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, phenyl $\text{C}_{2,6\text{-H}}$), 7.17 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, phenyl $\text{C}_{3,5\text{-H}}$), 7.15 (1H, s, NH), 3.81, 3.77 (1H, 2q, $J = 7.1$ Hz, sp-COCH), 3.71 (1H, q, $J = 7.1$ Hz, COCH), 2.48 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 1.81-1.51; 1.35-1.17; 0.81-0.71 (16H, m, sp-H, CH, CH_3 and $\text{sp}_2\text{-CH}_3$), 0.91 (6H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3), 0.85 (9H, s, *tert*-butyl CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz): 174.0, 168.8, 141.1, 137.7, 129.7, 127.4, 73.2, 45.0, 44.9, 38.6, 37.0, 36.9, 35.7, 30.1, 29.5, 29.4, 28.5, 22.3, 20.0, 18.2, 14.2. LC/MS (m/z): $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ requires 444.67 found $[\text{M} + \text{H}]^+$: 445.2. Anal. calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (444.67) C= 70.23, H= 9.07, N= 6.30. Found C= 70.00, H= 9.00, N= 6.22.

Biological Activity Assays

Materials

In the determination of AChE/BuChE inhibitory activity the following reagents were utilized: Acetylcholinesterase (Sigma C3389), acetylthiocholine iodide (ATChI; Sigma A5751), Butyrylcholinesterase (Sigma C7512), butyrylthiocholine iodide (BTChI; Sigma B3253), galantamine (Sigma G1660) and 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB; Sigma D8130).



Compound	R	R ₁
4a	H	H
4b	CH ₃	H
4c	C ₂ H ₅	H
4d	C ₃ H ₇	H
4e	C(CH ₃) ₃	H
5a	H	CH ₃
5b	CH ₃	CH ₃
5c	C ₂ H ₅	CH ₃
5d	C ₃ H ₇	CH ₃
5e	C(CH ₃) ₃	CH ₃

Figure 3. Synthesis of compounds 4,5. Reagents and conditions: (i) CH₃OH, conc. H₂SO₄, reflux; (ii), H₂NNH₂.H₂O, EtOH, reflux, 8 h; (iii) 4-(R)substituted cyclohexanone, mercaptoacetic acid or 2-mercaptopropionic acid, dry toluene, reflux, 6-8 h

Determination of AChE/BuChE Inhibitory Activity

The method devised by Ellman et al. (1961) was partially modified in order to determine the inhibitory effects of substances on AChE/BuChE. 10 µL of solutions prepared from compounds at different concentrations or the reference inhibitor, galantamine, were mixed with 220 µL of Ellman reagent (phosphate buffer pH 7.5, DTNB and substrate mixture). Following the addition of 20 µL of AChE/BuChE solution the absorbance increase at 412 nm was measured against the blank for 10 minutes at 25°C. Controls were prepared by adding 10 µL of solvent instead of compounds or reference inhibitor. The experiments were conducted in triplicate, and averages were calculated. The following formula was used to determine the samples' AChE/BuChE inhibitory activity (%) [21].

$$\text{Enzyme inhibitory activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Absorbance change of sample at 412 nm}}{\text{Absorbance change of control at 412 nm}}\right) \times 100$$

RESULT AND DISCUSSION

Chemistry

Spirothiazolidinone compounds (4a-e, 5a-e) were synthesized according to the procedure shown in Figure 3. Refluxing hydrazines and the related cyclohexanone with mercaptoacetic acid or 2-

mercaptopropionic acid in toluene for 6-8 hours using a Dean-Stark apparatus, afforded the targeted spirothiazolidinones. The structures of the compounds were verified by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$).

The IR spectra of the newly synthesized compounds (4a-e, 5a-e) revealed that the NH stretching bands of the carboxamide were signaled at between $3433\text{-}3257\text{ cm}^{-1}$. The new lactam carbonyl absorption bands ($1726\text{-}1705\text{ cm}^{-1}$) typical for 4-thiazolidinones demonstrated the desired cyclization, in the IR spectra of 4a-e and 5a-e.

A singlet signal at $\delta\ 7.30\text{-}7.23$ ppm in the $^1\text{H-NMR}$ spectra of compounds 4a-e was identified as the carboxamide N-H protons. The protons present in the aromatic ring resonated in the region $\delta\ 7.29\text{-}7.15$ ppm as doublets. The protons of 4a-e in the spirodecane C2-H2 resonated at approximately $\delta\ 3.54\text{-}3.55$ and 3.48 ppm as separate doublets, indicative of geminal interaction.

In the $^1\text{H NMR}$ spectra of 5a-e, the carboxamide NH protons resonated as a singlet (except for the compounds 5b and 5d which were observed as separate doublets $7.21\text{-}7.08$ ppm resulting from the chiral centers) at $\delta\ 7.28\text{-}7.13$ ppm. The C2-H protons of spirodecane 5a-e resonated at about $\delta\ 3.81\text{-}3.75$ ppm as two quartets.

The $^{13}\text{C NMR-APT}$ spectra of the new spirothiazolidinone derivatives (4a-e, 5a-e) demonstrated that the carbon signals of the spirocyclic lactam carbonyl and carboxamide carbonyl groups, were observed with the highest shift value, at $\delta\ 174.1\text{-}174.0$ and $171.7\text{-}168.8$ ppm, respectively. All the new compounds phenyl C4 carbons appeared at $\delta\ 141.1\text{-}141.0$ ppm, whereas phenyl C1 carbons resonated at $\delta\ 137.7\text{-}137.6$ ppm. Moreover, the presence of characteristic C5 resonances ($\delta\ 73.2\text{-}71.4$ ppm) in the APT spectra of 4 and 5, corresponding to the spirothiazolidinone structure, verified the expected spiro ring system's formation.

The mass spectra of the new compounds were acquired utilizing the positive electrospray ionization (ESI⁺) technique. The determined molecular weights of the compounds were confirmed by the ESI-MS with the detection of protonated $[\text{M}+\text{H}]^+$ ions.

***In vitro* AChE/BuChE Inhibitory Activities**

The modified Ellman's approach was utilized to assess the inhibitory effects of the novel spirothiazolidinone derivatives (4, 5) on AChE and BuChE. Galantamine was used as standard inhibitor. Table 1 outlines the IC_{50} values of compounds 4 and 5 for both AChE and BuChE.

All new compounds (4, 5) inhibited the AChE at the micromolar levels. Among the tested compounds, the *tert*-butyl substituted 4e was found as the most effective inhibitor on AChE ($\text{IC}_{50} = 39.53 \pm 1.94\ \mu\text{M}$).

Additionally, the BuChE inhibitory activity of compounds 4 and 5 was assessed. The most effective inhibitory action against BuChE was demonstrated by compound 4b ($\text{IC}_{50} = 95.97 \pm 1.79\ \mu\text{M}$).

The addition of a *tert*-butyl group to the spirothiazolidinone rings enhances the inhibitory effect on AChE (i.e., compounds 4e and 5e). On the other hand, methyl substitution at spirothiazolidinone rings resulted in an increase in the inhibitory activity on BuChE (i.e., compounds 4b and 5b). Besides that, the addition of propyl substitution in spirothiazolidinone rings resulted in no inhibitory activity on BuChE. (i.e., compounds 4d and 5d).

Conclusion

In conclusion, here, we present the chemical synthesis and inhibitory activity against AChE and BuChE of a new series of *N*-(3-oxo-1-thia-4-azaspiro[4.5]decan-4-yl)carboxamides. All tested compounds showed intermediate activity against AChE and BuChE. At the micromolar level, compound 4e was found to be the most effective inhibitor of AChE among the tested derivatives. Structural modifications in the compounds may lead to the generation of new derivatives with increased activity and high selectivity. Consequently, this class of new compounds would be promising in the therapy of Alzheimer's disease.

Table 1. Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) inhibitory activities of the compounds

Compound	AChE inhibitory activity IC ₅₀ values (μM)	BuChE inhibitory activity IC ₅₀ values (μM)
4a	216.10±3.76	365.10±19.68
4b	106.35±2.32	95.97±1.79
4c	92.09±0.87	116.83±0.08
4d	128.65±3.45	-
4e	39.53±1.94	287.75±19.25
5a	219.11±8.31	264.39±23.72
5b	198.14±2.46	153.09±0.85
5c	129.91±1.31	215.81±3.69
5d	140.10±2.12	-
5e	124.09±0.87	-
Galantamine	5.01±0.34	36.75±1.00

Values are given as the mean of three replicates±standard deviation

The results were expressed as the IC₅₀ value (the sample concentration required to inhibit enzyme activity by 50%)

Through the use of dose-response curve linear regression analysis, IC₅₀ values were determined

The compounds numbered 4d, 5d and 5e did not exhibit any BuChE inhibitory activity at the investigated concentrations

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: C.B.A.; Design: C.B.A., G.H.C.; Control: C.B.A., T.Y.O.; Sources: C.B.A., G.H.C., T.Y.O.; Materials: C.B.A., G.H.C.; Data Collection and/or Processing: C.B.A., G.H.C.; Analysis and/or Interpretation: C.B.A., G.H.C.; Literature Review: C.B.A., G.H.C., T.Y.O.; Manuscript Writing: C.B.A., G.H.C., T.Y.O.; Critical Review: C.B.A., G.H.C., T.Y.O.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

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

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

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

REFERENCES

1. Querfurth, H.W., Laferla, F.M. (2010). Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 362(4), 329-344. [\[CrossRef\]](#)
2. Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C.E., Cummings, J., van der Flier, W. (2021). Alzheimer's disease. *Lancet*, 397, 1577-1590. [\[CrossRef\]](#)
3. Vaz, M., Silvestre, S. (2020). Alzheimer's disease: Recent treatment strategies. *European Journal of Pharmacology*, 887, 173554. [\[CrossRef\]](#)
4. Davies, N.M. (1998). Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years. *Clinical Pharmacokinetics*, 34, 101-154. [\[CrossRef\]](#)
5. Halford, G.M., Lordkipanidzé, M., Watson, S.P. (2012) 50th anniversary of the discovery of ibuprofen: An interview with Dr Stewart Adams. *Platelets*, 23, 415-422. [\[CrossRef\]](#)
6. McGeer, P.L., Guo, J.P., Lee, M., Kennedy, K., McGeer, E.G. (2018). Alzheimer's disease can be spared by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Alzheimer's Disease*, 62, 1219-1222. [\[CrossRef\]](#)
7. Wilkinson, B.L., Cramer, P.E., Varvel, N.H., Reed-Geaghan, E., Jiang, Q., Szabo, A., Herrup, K., Lamb B.T., Landreth, G.E. (2012). Ibuprofen attenuates oxidative damage through NOX2 inhibition in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 33, 197, e21-32. [\[CrossRef\]](#)
8. Cihan-Üstündağ, G., Naesens, L., Şatana, D., Erköse-Genç, G., Mataracı-Kara, E., Çapan, G. (2019). Design, synthesis, antitubercular and antiviral properties of new spirocyclic indole derivatives. *Monatshefte Fur Chemie*, 150, 1533-1544. [\[CrossRef\]](#)

9. Look, G.C., Schullek, J.R., Holmes, C.P., Chinn, J.P., Gordon, E.M., Gallop, M. (1996). The identification of cyclooxygenase-1 inhibitors from 4-thiazolidinone combinatorial libraries. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 6, 707-712. [\[CrossRef\]](#)
10. Tahmasvand, R., Bayat, P., Mahmood, S., Dehghani, S. (2020). Design and synthesis of novel 4-thiazolidinone derivatives with promising anti-breast cancer activity: Synthesis, characterization, *in vitro* and *in vivo* results. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 104, 104276. [\[CrossRef\]](#)
11. Suthar, S.K., Jaiswal, V., Lohan, S., Bansal, S., Chaudhary, A., Tiwari, A., Alex A.T., Joesph, A. (2013). Novel quinolone substituted thiazolidin-4-ones as anti-inflammatory, anticancer agents: Design, synthesis and biological screening. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 63, 589-602. [\[CrossRef\]](#)
12. Liu, Z., Chai, Q., Li, Y.Y., Shen, Q., Ma, L.P., Zhang, L., Wang, X., Sheng, Li., Li, J., Li, J., Shen, J. (2010). Discovery of novel PTP1B inhibitors with antihyperglycemic activity. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31, 1005-1012. [\[CrossRef\]](#)
13. Almasirad, A., Ghadimi, M., Mirahmadi, S., Ahmadian Kodakan, P., Jahani, R., Nazari, M., Rezaee, E., Azizian, H., Rabizadeh, P., Tabatabai, S.A., Faizi, M. (2022). Design, synthesis, and preliminary pharmacological evaluation of novel thiazolidinone derivatives as potential benzodiazepine agonists. *Molecular Diversity*, 26, 769-780. [\[CrossRef\]](#)
14. Cihan-Üstündağ, G., Zopun, M., Vanderlinden, E., Ozkirimli, E. (2020). Superior inhibition of influenza virus hemagglutinin-mediated fusion by indole-substituted spirothiazolidinones, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 28, 115130. [\[CrossRef\]](#)
15. Ashraf, M., Hussain, R., Khan, S., Rehman, W., Khan, Y., Sardar, A., Aziz, T., Khowdiary, M.M. (2024). In vitro and in silico correlation of benzoxazole-based thiazolidinone hybrids derivatives: A promising acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, 1301, 137317. [\[CrossRef\]](#)
16. Bilgicli, H.G., Taslimi, P., Akyuz, B., Tuzun, B., Gulcin, İ. (2020). Synthesis, characterization, biological evaluation, and molecular docking studies of some piperonyl-based 4-thiazolidinone derivatives. *Archiv der Pharmazie*, 353(1), e1900304. [\[CrossRef\]](#)
17. Kocabalkanli, A., Cihan-Ustundag, G., Naesens, L., Mataraci-Kara, E., Nassozi, M., Capan, G., (2017). Diclofenac-based hydrazones and spirothiazolidinones: Synthesis, characterization, and antimicrobial properties. *Archiv der Pharmazie*, 350(5), e1700010. [\[CrossRef\]](#)
18. Goktas, F., Vanderlinden, E., Naesens, L., Cesur, N., Cesur, Z., (2012). Microwave assisted synthesis and anti-influenza virus activity of 1-adamantyl substituted N-(1-thia-4-azaspiro[4.5]decan-4-yl)carboxamide derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(24), 7155–7159. [\[CrossRef\]](#)
19. Yousefi, M., Mohammadi, M., Habibi, Z. (2014). Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 104, 87-94. [\[CrossRef\]](#)
20. Kumsi, M., Poojary, B., Lobo, P.L., Kumari, N.S., Chullikana, A. (2010). Synthesis, characterization and biological studies of some bioactive thiazolotriazole derivatives. *Zeitschrift Fur Naturforsch*, 65, 1509-1515. [\[CrossRef\]](#)
21. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95. [\[CrossRef\]](#)



MUSHROOM DERIVED COMPOUNDS UNVEILED NARINGIN AS A POTENTIAL MULTI-TARGETED ANTI-BREAST CANCER COMPOUND - AN *IN-SILICO* APPROACH

MANTAR TÜRETİLMİŞ BİLEŞİKLER, NARİNGİN'İN POTANSİYEL ÇOK HEDEFLİ MEME KANSERİ KARŞITI BİR BİLEŞİK OLDUĞUNU ORTAYA ÇIKARDI - BİR İN-SİLİCO YAKLAŞIMI

Ravichandran VEERASAMY^{1,2*} , Raghuraman SEENIVASAN³ , Harish RAJAK⁴ ,
Parasuraman PAVADAI⁵ , Prabha THANGAVELU⁶ 

¹AIMST University, Faculty of Pharmacy, 08100, Semeling, Malaysia

²Saveetha University, Saveetha Dental College and Hospitals, Saveetha Institute of Medical and Technical Sciences, Chennai, Tamil Nadu, India

³Shri Venkateshwara College of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Ariyur, Pondicherry, India

⁴Guru Ghasidas University, Department of Pharmacy, Bilaspur, India

⁵M.S. Ramaiah University of Applied Sciences, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Mathikere, Bangalore, Karnataka, India

⁶Nandha College of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Erode, India

ABSTRACT

Objective: *The study aimed to evaluate the multiple target effect of phytochemicals of mushroom against breast cancer using molecular docking and dynamics approach.*

Material and Method: *In this study, the binding affinity of forty mushroom phytochemicals with various breast cancer proteins such as epidermal growth factor receptor (EGFR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), topoisomerase II α and topoisomerase II β were investigated by docking study using the PyRx tool. The selected receptors are highly cancer influencing and they were selected based on literature. Further molecular dynamics studies were also carried out to confirm the stability and conformation of the naringin-protein complex. In-silico ADMET studies were also carried out to confirm the pharmacokinetic properties and toxicity of the mushroom phytochemicals.*

Result and Discussion: *From the results obtained, colossolactone G, antcin-A, and formipinoside had higher affinity to EGFR than normal neratinib. Furthermore, fomitocide K, naringin and antcin-A were found to have higher binding affinity than neratinib with HER2. Besides, ergone, naringin, and ergosterol showed higher binding affinity than doxorubicin during interactions with topoisomerase II α . On the other hand, antrocin, ergosterol peroxide and naringin demonstrated higher binding affinity against topoisomerase II β than doxorubicin. Further molecular dynamics studies were also carried out to confirm the stability and conformation of the naringin-protein complex which revealed the best binding score against all the four tested enzymes. Overall, this study suggests naringin as the best ligand and may have great potential in breast cancer protein inhibitors development. To demonstrate their therapeutic promise against breast cancer, more in vitro and in vivo research might be required.*

Keywords: *Breast cancer, molecular docking, molecular dynamics, mushroom, naringin*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Ravichandran Veerasamy
e-mail / e-posta: phravi75@rediffmail.com, **Phone / Tel.:** +044298000/1278

Submitted / Gönderilme : 09.07.2024

Accepted / Kabul : 30.09.2024

Published / Yayınlanma : 20.01.2025

ÖZ

Amaç: Çalışma, mantar fitokimyasallarının meme kanserine karşı çoklu hedef etkisini moleküler yerleştirme ve dinamik yaklaşımı kullanarak değerlendirmeyi amaçladı.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada PyRx aracını kullanarak kırk mantar fitokimyasalının epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2), topoizomeraz IIa ve topoizomeraz IIβ gibi çeşitli meme kanseri proteinlerine bağlanma afinitesi docking çalışmasıyla araştırıldı. Seçilen reseptörler yüksek oranda kansere etki etmektedir ve literatüre dayanılarak seçilmiştir. Naringin-protein kompleksinin stabilitesini ve konformasyonunu doğrulamak için daha ileri moleküler dinamik çalışmalar da yapıldı. Mantar fitokimyasallarının farmakokinetik özelliklerini ve toksisitesini doğrulamak için *in-silico* ADMET çalışmaları da yapıldı.

Sonuç ve Tartışma: Elde edilen sonuçlara göre kolosolakton G, antcin-A ve formipinosidin EGFR'ye afinitesi normal neratinib'e göre daha yüksekti. Ayrıca fomitosisid K, naringin ve antcin-A'nın HER2 ile neratinibden daha yüksek bağlanma afinitesine sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca ergon, naringin ve ergosterol, topoizomeraz IIa ile etkileşimler sırasında doksorubisinden daha yüksek bağlanma afinitesi göstermiştir. Öte yandan antrosin, ergosterol peroksit ve naringin topoizomeraz IIβ'ya karşı doksorubisinden daha yüksek bağlanma afinitesi göstermiştir. Test edilen dört enzimin tümüne karşı en iyi bağlanma skorunu ortaya koyan naringin-protein kompleksinin stabilitesini ve konformasyonunu doğrulamak için daha ileri moleküler dinamik çalışmalar da yapıldı. Genel olarak bu çalışma, naringinin en iyi ligand olduğunu ve meme kanseri protein inhibitörlerinin geliştirilmesinde büyük potansiyele sahip olabileceğini öne sürüyor. Meme kanserine karşı tedavi vaatlerini göstermek için daha fazla *in vitro* ve *in vivo* araştırmaya ihtiyaç duyulabilir.

Anahtar Kelimeler: Mantar, meme kanseri, moleküler dinamik, moleküler kenetlenme, naringin

INTRODUCTION

Female breast cancer surpassed lung cancer as the major cause of global cancer incidence. Breast cancer (BC) accounts for 11.7% of all cancer cases and contributes to 685.000 deaths worldwide, making it the fifth highest cause of cancer mortality. Although geo-graphical variances occur between countries, BC remains the top cause of death in women aged 20 to 50 years [1]. Beside BC is the most common cancer in women around the world, and it is curable in 70-80% of patients with early-stage, non-metastatic cancer. Although the prevalence of BC is higher in developing countries, the rates of BC are escalating in almost every nation around the globe [2].

BC is widely recognized as a highly heterogeneous cancer type [3], encompassing distinct phenotypic and morphological profiles, resulting in highly distinctive clinical behaviors [4]. Clinically, BC is categorized into three basic types based on histological classification. They are hormone receptor positive, HER2 positive (HER2+), and triple negative BCs. Among the crucial hallmarks of cancer, angiogenesis plays a significant role particularly in BC. Vascular endothelial growth factor (VEGF) holds the title of the most potent stimulator of angiogenesis [5]. Topoisomerase II exists in mammalian cells in two closely related isoforms: topoisomerase IIα (170 kDa form) and isoforms: topoisomerase IIβ (180 kDa form). Breast cancer cells exhibit increased isoforms: topoisomerase IIα expression. So, isoforms: topoisomerase II inhibitors could exert anti-tumor effects on breast cancer [6-9].

For the past few decades, phytoconstituents of natural products have been extensively used for the treatment of cancer with high efficacy and minimal side effects [10]. Generally, traditional knowledge has led researchers to screen activity in plants, animals, and mushrooms for drug discovery from natural products. However, increasing numbers of scientists are interested in less expensive and time-consuming approaches of identifying potential compounds for specific targets, such as *in-silico* screening of previously reported substances [11-14].

Mushrooms are a valuable natural source of both food and medicine. Polysaccharides, proteins, lipids, phenols, tocopherols, alkaloids, flavonoids, carotenoids, ash, folic acid, essential oils, ascorbate enzymes, glycosides, and organic acids are some of the bio-active chemicals found in fungi which have demonstrated a wide range of pharmacological activity. Furthermore, krestin, calcaelin, hispolone, ganocidin, lectin, illudin S, hericium erinaceus polysaccharides A and B (HPA and HPB), lentinan,

schizophyllan, psilocybin, laccase, and a wide range of active compounds in mushrooms have exhibited anticancer potential [15]. Mushroom extracts and mushroom bioactive compounds have also been reported for activities, such as anticancer, antioxidative, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory and other effects [16-20]. Besides, edible mushrooms have been used in cancer treatment, as an adjunct to conventional treatment or as a means of combating the side effects of cancer treatment. Extracts and substances isolated from fungi exhibited multiple mechanisms of anticancer activity; for example, they are reported to exert their effects by inhibiting kinases and the cell cycle or inhibiting angiogenesis and inducing reactive oxygen species, antimetabolic agents, or topoisomerase inhibitor's function, ultimately stimulating apoptosis in cancer cells. Moreover, mushroom consumption reduces breast cancer risk and thus prevents ER+/PR+ tumors in breast cancer patients [17,21].

Although there are conventional cancer treatments such as surgery, radiotherapy and chemotherapy, their side effects can cause serious harm and suffering to patients. Nowadays patients give great importance to the quality of life and opt for natural products which exhibit minimal side effects as a treatment option. Mushrooms are natural resources with minimally toxic bioactive components and have various useful biological activities. Mushroom species are the most effective natural remedies against various cancers. However, 90% of mushroom species have never been studied for their antitumor effects. In addition, cancer-associated fungi studies have been performed that only involve the characterization of non-specific cytotoxic or cytostatic effects on cancer cells [11,16,22]. Therefore, compounds derived from mushrooms are of great interest for the development of anti-cancer drugs. Molecular docking studies of mushroom phytochemicals against various targets implicated in breast cancer development will determine the likelihood and mechanism of these compounds as potential breast cancer treatments.

This study aimed to study the molecular interaction between mushroom phytochemicals and breast cancer proteins through molecular docking and hypothesized that fungal phytochemicals might exert their inhibitory effect on breast cancer by interacting with breast cancer proteins. In this molecular docking study, naringin was found to be the best ligand to inhibit breast cancer proteins.

MATERIAL AND METHOD

The structure of chemical compounds derived from mushroom and proteins (Breast Cancer) were collected from online databases like PubChem and Protein Data Bank, respectively. The modeling software Chem. Office-16 (www.cambridgesoft.com/Ensemble_for_Chemistry/details/Default.aspx?fid=16), Discovery Studio Client 2021 (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>), Swiss Protein Data Base Viewer (<https://spdbv.vital-it.ch/>), PyRx (<https://pyrx.sourceforge.io/>), were used in the present research study.

Preparation of Phytochemicals of Mushroom

The structure of the phytochemicals of mushroom were downloaded from PubChem and checked. The selected structures were subjected for energy / geometry optimization by using MM2 force field techniques in Chem3D tool of Chem. Office 16. Then charges were added and then saved as '.sdf' file for further use.

Preparation of Protein (Breast Cancer)

The X-ray crystallographic structure of proteins of breast cancer EGFR, HER2, topoisomerase II α and topoisomerase II β were downloaded from Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>). The downloaded EGFR, HER2, topoisomerase II α and topoisomerase II β are non-mutated with resolutions of 2.60 Å, 3.21 Å, 2.90 Å, and 2.55 Å, respectively. The structures of proteins were checked for any missed atoms using Swiss Protein Data Base Viewer and fixed. The information about the active site of the proteins (XYZ coordinates) were retrieved from PDB and gathered from related published articles, as well as determined by using Discover Studio Client 2021. Then water and other hetero atoms were removed from the structure of protein by using the tools available in Discovery Studio Client 2021 with default setting. Hydrogen atoms were added to the proteins and saved as in '.pdb' format.

Docking Studies

The Virtual Screening software interface PyRx (AutoDock Vina docking mechanism) was used to upload selected chemical compounds and protein structures. Before docking, the protein molecules were transformed to macromolecules. Then, using PyRx's relevant tools, both chemical compounds and protein structures were converted into '.pdbqt' format, which automatically minimized energy and incorporated charges to both micro and macromolecules. The active binding site grid box was created by utilizing the capabilities offered in PyRx. The docking was then done in PyRx with the AutoDock Vina utility. The docking or binding affinity scores with different conformers of the chemical compound were displayed by the software once the docking studies were completed. The docking output files were then downloaded as '.csv' files. The chemical compounds with the lowest energy conformers were chosen and examined for interaction with amino acids of protein utilizing Discovery Studio Client 2021. To observe the binding interactions between ligand and target, representations of the docking pose and interactions were obtained and preserved [23-25]. After docking was completed, the optimal conformer was chosen based on docking affinity and better bond interaction, and the interaction mechanism was explained.

Molecular Dynamic Simulation

MD simulations were performed for EGFR, HER2, Topoisomerase II α and Topoisomerase II β separately and with naringin by using online web server WebGro (<https://simlab.uams.edu/>) with GROMACS to perform the calculations [26-28]. The input parameters for this study were force field GROMACS9643a, box type triclinic, water model SPC, temperature 300 K, and salt type NaCl. Pressure (1bar), number of frames per simulation (1000), and simulation time (100 ns) were employed as equilibration and MD run parameters. To create the topology of melianone, the internet server GlycoBioChem PRO-DRG2 was utilized [29]. According to the information available, the docked molecules' data were put into the PRODRG2 server to generate the zip file. The following trajectories are provided by MD simulation: root mean square deviation (RMSD), root mean square fluctuation (RMSF), radius of gyration (Rg), and hydrogen bonds (HBs).

In-Silico ADME and Toxicity Studies

SWISS ADME and ProTox-II online tools were used to estimate the ADME characteristics and toxicity of mushroom phytochemicals.

RESULT AND DISCUSSION

Forty phytochemicals from mushrooms were chosen as ligands and their interactions on the proteins involved in breast cancer were studied by molecular docking techniques in the present work. The forty phytochemicals of mushrooms were chosen from the work reported by Rangsinth et al. (2021) [30]. When these phytochemicals from mushrooms were employed for *in-silico* screening of inhibition against SARS-CoV-2, they found that all the compounds had affinity towards the main protease of SARS-CoV-2. Suwannarach et al. (2020) also reviewed the antiviral activity of phytochemicals from mushrooms [31]. As a result, we selected to screen these phytochemicals against several breast cancer targets to find a few compounds that were both anti-breast cancer and anti-SARS-CoV-2. The targeted proteins, EGFR (PDB ID: 1M17), HER2 (PDB ID: 3RCD), topoisomerase II α (PDB ID: 4FM9) and topoisomerase II β (PDB ID: 4G0V) were used. The binding affinities of mushroom phytochemical compounds against breast cancer target proteins were compared with NRT and DOX.

Nuclear enzymes called DNA topoisomerases catalyze the addition of topological modifications to the DNA molecule. Type II topoisomerase, known as human topoisomerase II, has been demonstrated to be a useful target in the treatment of a variety of malignancies. Topoisomerase II α and topoisomerase II β are the two isoforms of this enzyme that are present in human cells. Topoisomerase II β expression is uniformly distributed across all cells and serves as a biomarker for cell proliferation, but topoisomerase II α is overexpressed in proliferating cells. As a result, topoisomerase II α is thought to be responsible for topoisomerase II inhibitors' anticancer effects [32].

NRT was selected as a standard drug in the present study to compare with tested phytochemicals since it has been proven effective *in vitro* and *in vivo* against HER2-overexpressing or mutant cancers. The EGFR (or HER1), HER2 and HER4 tyrosine kinase activity is bound and inhibited by NRT, an irreversible tyrosine kinase inhibitor, which results in decreased phosphorylation and activation of downstream signaling pathways [33].

The frequency of hydrogen bonds forming between the ligand protein complex was related to the intensity of the inhibitors' interactions with the receptors. The outcome revealed a relationship between the hydrogen bonds, hydrophobic bonds, and electrostatic bonds present in the compounds under study and the score, which represented the binding affinity of the compounds reported as binding free energy in kcal/mol [34].

Docking

The docking studies of phytochemicals of mushroom [30], neratinib (NRT) and doxorubicin (DOX) (Table 1) were carried out against EGFR, HER2, topoisomerase II α and topoisomerase II β (Figure 1) of BC. The dimensions of the grid boxes of BC proteins are shown in Table 2, and Table 1 lists the binding affinities of phytochemicals against the proteins. Amino acids of proteins interacted with NRT, DOX and phytochemicals of mushroom are given in Table 3. NRT was selected as a standard drug in the present study to compare with tested phytochemicals against EGFR and HER2, since it has been proven effective *in vitro* and *in vivo* against HER2-overexpressing or mutant cancers. DOX was selected as standard for docking against topoisomerase II α and topoisomerase II β since it has been proven effective *in vitro* and *in vivo* against topoisomerase II α and topoisomerase II β in cancers.

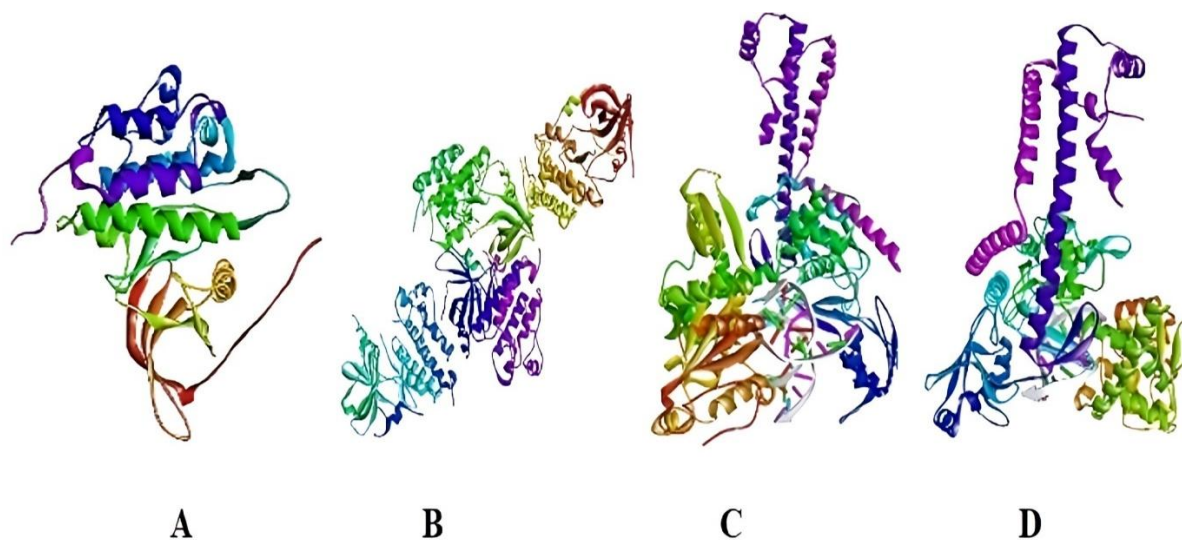


Figure 1. The PDB downloaded structure of A) EGFR (PDB ID: 1M17), B) HER2 (PDB ID: 3RCD), C) topoisomerase II α (PDB ID: 4FM9), D) topoisomerase II β (PDB ID: 4G0V)

Table 1. Binding affinity among the 40 phytochemicals of mushroom and neratinib towards different breast cancer target proteins [34]

	Name of compounds	Binding affinity (kcal/mol)			
		EGFR (PDB ID: 1M17)	HER2 (PDB ID: 3RCD)	Topoisomerase II α (PDB ID: 4FM9)	Topoisomerase II β (PDB ID: 4G0V)
1	2,3,6,23-Tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid	-8.4	-8.5	-8.1	-5.3
2	Antcin-A	-9.4	-9.9	-8.8	-5.5
3	Antrocin	-6.6	-7.7	-7.9	-6.0
4	Antroquinol	-6.6	-8.5	-7.5	-4.3
5	Beta-D-glucan	-7.7	-7.4	-6.9	-4.3
6	Colossolactone G	-9.7	-9.7	-9.2	-5.3
7	Cordycepin	-7.0	-7.4	-7.3	-4.7
8	Ellagic acid	-9.0	-7.9	-9.3	-5.0
9	Ergone	-9.3	-9.6	-9.6	-5.1
10	Ergosterol peroxide	-9.1	-9.6	-9.4	-5.8
11	Ergosterol	-8.8	-9.6	-8.7	-5.4
12	Fomitoid K	-9.1	-9.9	-8.4	-4.7
13	Formipinoside	-9.2	-8.7	-7.8	-4.6
14	Gallic acid	-5.7	-6.1	-6.4	-4.6
15	Ganoderic acid F	-9.1	-9.5	-8.7	-5.4
16	Ganoderiol A	-8.7	-8.8	-8.1	-5.1
17	Ganodermanontriol	-8.9	-9.0	-8.4	-5.0
18	Ganomycin B	-8.0	-9.4	-7.6	-4.7
19	Grifolin	-6.9	-8.4	-7.4	-4.1
20	Hispidin	-7.6	-7.7	-7.8	-5.0
21	Hispolon	-6.6	-6.7	-6.9	-4.7
22	Ibotenic acid	-5.4	-5.9	-6.3	-4.5
23	Illudin S	-6.8	-6.4	-7.8	-5.5
24	Inonotic acid A	-6.9	-7.4	-7.3	-4.7
25	L-Theanine	-5.0	-5.2	-5.6	-4.4
26	Lucialdehyde A	-8.7	-9.1	-8.3	-4.8
27	Lucialdehyde B	-8.9	-9.0	-8.8	-5.3
28	Lucialdehyde C	-8.8	-9.0	-8.2	-5.3
29	Lucidiol	-8.5	-8.8	-8.5	-5.1
30	Lucidenic acid A	-8.3	-8.9	-8.4	-4.9
31	Lucidenic acid C	-8.6	-8.3	-7.9	-5.5
32	Lucidenic acid D	-7.8	-9.0	-8.5	-4.9
33	Lucidenic acid E	-8.1	-8.9	-8.0	-4.9
34	Lucidenic acid N	-8.1	-8.5	-8.2	-4.7
35	Lucidumol B	-8.6	-9.0	-8.2	-5.3
36	Lupeol	-8.9	-9.1	-9.5	-5.2
37	Naringin	-9.1	-9.9	-9.5	-5.7
38	Panepoxydone	-6.1	-6.6	-7.3	-4.7
39	Psilocybine	-6.2	-6.1	-6.9	-4.5
40	Vulpinic acid	-8.0	-8.5	-7.4	-4.7
41	NRT	-8.2	-9.4	--	--
42	DOX	--	--	-8.8	-5.1

The bolded numbers indicate the better binding affinity score for the protein. Naringin was selected to proceed with the MD simulations, as explained later. NRT – Neratinib, DOX- Doxorubicin

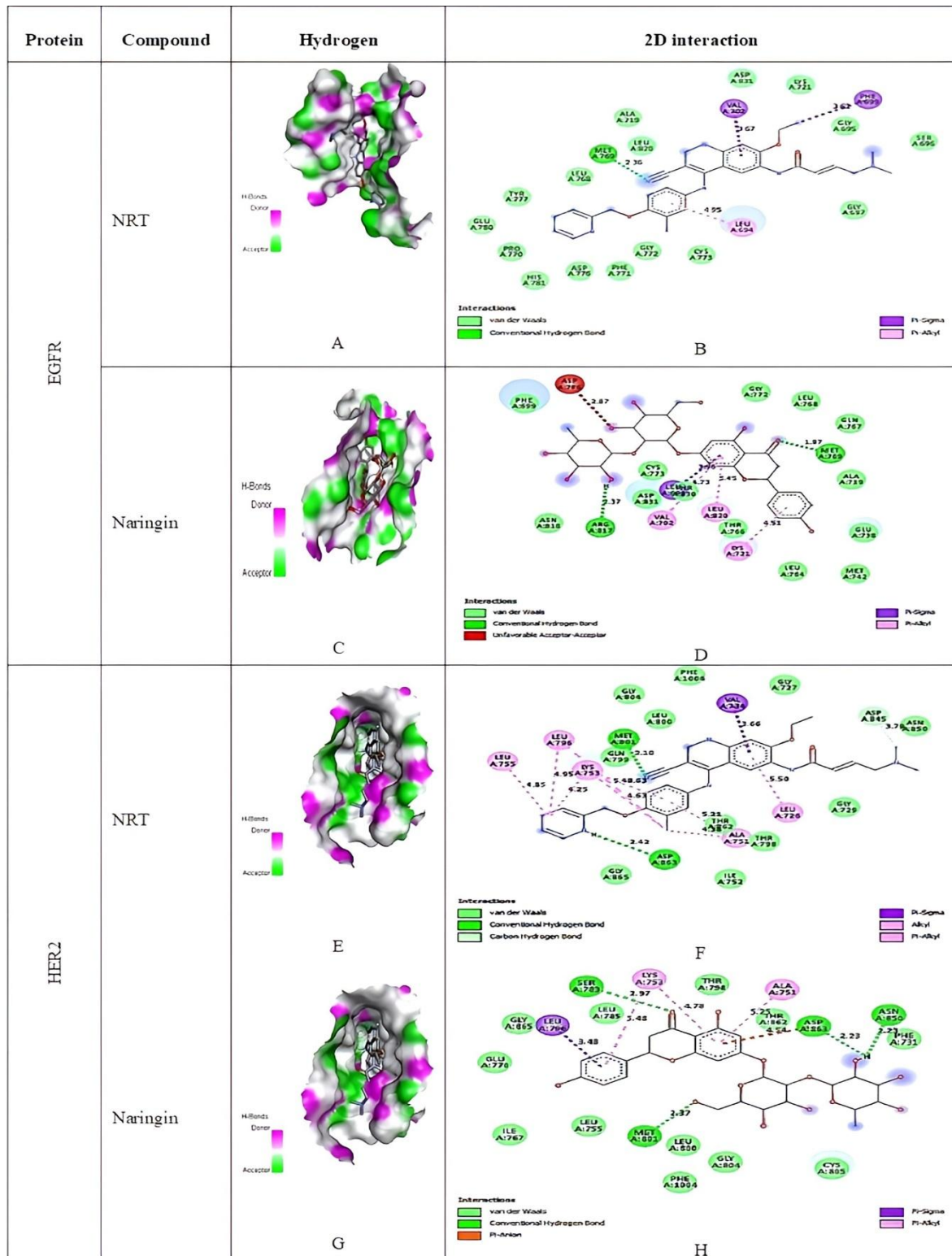


Figure 2. A) Docking pose of NRT on hydrogen bonding surface of EGFR, B) 2D interaction of NRT with EGFR, C) Docking pose of naringin on hydrogen bonding surface of EGFR, D) 2D interaction of naringin with EGFR, E) Docking pose of NRT on hydrogen bonding surface of HER2, F) 2D interaction of NRT with HER2, G) Docking pose of naringin on hydrogen bonding surface of HER2, H) 2D interaction of naringin with HER2. NRT - Neratinib

The docking pose and 2D interaction diagram of NRT and naringin with EGFR are shown in Figure 2A-2D, with HER2 are shown in Figure 2E-2H, with topoisomerase II α are shown in Figure 3A-3D and with topoisomerase II β are shown in Figure 3E-3H, respectively. From the results of the current docking studies, it was found that colossolactone G, antcin-A, ergone, ergosterol peroxide, formipinioside, fomitoside K, ganoderic acid F and naringin had better finding affinity towards EGFR than NRT. Meanwhile colossolactone G, antcin-A, ergone, ergosterol peroxide, ergosterol, fomitoside K, ganoderic acid F and naringin showed better finding affinity towards HER2 than NRT. However, colossolactone G, ergone, ergosterol peroxide, lupeol and naringin exhibited better affinity towards topoisomerase II α than NRT. Further antrocin, ergosterol peroxide and naringin shown better finding affinity towards topoisomerase II β than NRT.

Based on the results, the binding affinity between NRT and EGFR (PDB ID: 1M17, Figure 1A) was -8.2 kcal/mol (Table 1). The compounds with high binding affinity were colossolactone G, antcin-A, formipinioside and naringin than NRT with -9.7 kcal/mol, -9.4 kcal/mol, -9.2 kcal/mol and -9.1 kcal/mol, respectively (Table 1). All these compounds and NRT interacted with EGFR with various hydrogen bonding and hydrophobic bonding (Table 3).

NRT interacted with EGFR by forming a strong conventional hydrogen bond with Met769 as a hydrogen donor with distance of 2.36Å. It also established hydrophobic bonds such as π -sigma interaction with Val702 and Phe699 with 3.67Å and 3.62Å distance respectively, as well as π -alkyl interaction with Leu694 with distance of 4.95Å. Where Phe699 acts as π -orbitals, while Leu694 is alkyl. The amino acids that were involved in van der Waals interactions were Asp 831, Lys721, Gly695, Ser696, Gly697, Cys773, Gly772, Phe771, Asp776, His781, Pro770, Glu780, Tyr777, Leu768, Leu820 and Ala719 (Table 3, Figure 2A and B).

When colossolactone G was docked with EGFR, it formed strong conventional hydrogen bond with Thr830 with bond length 2.29Å which was stronger than two conventional hydrogen bonds formed by antcin-A with EGFR through Thr830 with distance of 2.35Å and 2.83Å. However, the conventional hydrogen bond with 2.43Å distance formed by colossolactone G with Asp831 was slightly greater than conventional hydrogen bond formed by formipinioside with Asp831 (2.42Å). Other than that, colossolactone G formed a carbon hydrogen bond with Gly772 which acts as hydrogen donor with 3.63Å distance. After docking of formipinioside to EGFR, it formed strong conventional hydrogen bond at Lys721 with distance of 2.85Å and 2.24Å. Formipinioside also formed hydrophobic bonding such as alkyl interaction with Leu694 which is an alkyl with 4.20Å and 4.59Å distance.

Meanwhile, naringin formed two conventional hydrogen bond interaction with Met769 and Arg817 of EGFR with bond length of 1.97Å and 2.37 Å (Table 1). The amino acids Leu694, Val702, Lys721, and Leu820 were hydrophobically interacted with EGFR. Amino acids Phe699, Ala719, Glu738, Met742, Leu764, Thr766, Gln767, Leu768, Gly772, Cys773, Asp831, Asn818 interacted with EGFR through van der Waals interactions (Table 3, Figure 2C and D). Even though naringin had a bit low binding affinity than colossolactone G, antcin-A, and formipinioside, it had two strong hydrogen bonds formation with EGFR compared to the earlier said three compounds. Moreover, naringin had a strong hydrogen bond with Met769 and hydrophobic interaction with Leu694 and Val702 as same as the standard drug NRT.

In addition, according to the results the binding affinity between NRT and HER2 (PDB ID: 3RCD, Figure 1B) was -9.4 kcal/mol, while the compounds of mushroom: fomitoside K, naringin and antcin-A showed better binding affinity of -9.9 kcal/mol (Table 1). Hence, these compounds were selected to compare with NRT. NRT (Figure 2E and F) and the selected compounds interacted with HER2 through various bonding interactions including hydrogen bonding and hydrophobic bonding. However, only naringin had electrostatic bonding with HER2 (Figure 2G and H).

In the case of the interaction of NRT with HER2, NRT formed strong conventional hydrogen bond with Met801 with 2.10Å distance and Asp863 with a distance of 2.42Å. It was also confirmed that a carbon hydrogen bond with Asp845 with 3.79Å distance. All these amino acids are hydrogen acceptors, except Met801 which is a hydrogen donor. Other than that, 10 hydrophobic bonds were found between the interactions of NRT and HER2 (Figure 2E and F). First, π -sigma interaction with distance of 3.66Å at Val734. The amino acids that are involved in alkyl interaction were Ala751 (4.38Å), Lys753

(4.25Å, 4.63Å), Leu796 (5.42Å, 4.95Å), Leu755 (4.85Å). Lastly, π -alkyl interactions were observed at Leu726, Ala751 and Lys753 with bond length of 5.50Å, 5.21Å and 4.63Å.

In comparison of the hydrogen bonding among NRT and selected phytochemicals, naringin formed a greater number of hydrogen bonds with HER2. Although naringin formed weaker conventional hydrogen bond with Met801 with bond length of 2.37Å than NRT (2.10 Å), it showed shorter bond length at Asp863 (2.23Å) when compared to NRT (2.42Å) and antcin-A (2.62Å, 2.17Å). The major difference is that naringin formed an electrostatic bond, π -anion, with Asp863 with bond length of 4.54Å (Figure 2G and H). However, based on the 2D interaction diagram of fomitoside K with HER2, one unfavorable bond between amino acid Asp863 and fomitoside K was observed.

Hydrophobic interactions, π -alkyl interactions, between naringin and HER2 were observed at amino acid residues, those are similar as involved in interaction with NRT, Ala751 with bond length 5.25Å and Lys753 with bond length of 4.78Å and 5.48Å (Figure 2G and H). When antcin-A docked with HER2, three alkyl interactions were observed at Val734, Ala751 and Leu852 with distance of 4.61Å, 4.65Å and 4.85Å, respectively. Alkyl interaction with amino acid Ala751 was observed in NRT. For fomitoside K, strong conventional hydrogen bonds were observed with Glu770 with bond length of 2.68Å and Gly865 with distance of 2.14Å, and both Glu770 and Gly865 act as hydrogen donor. There was also an alkyl interaction with Leu785 at bond length of 4.70Å and π -alkyl interaction with Phe864 at 5.04Å distance. Nevertheless, it does not have any similarity in interactions with HER2 as NRT and the other selected compounds.

Based on the results, the binding affinity between DOX and topoisomerase II α (PDB ID: 4FM9, Figure 1C) was -8.8 kcal/mol, while three compounds of mushroom: ergone, naringin and ergosterol peroxide were showed better binding affinity than NRT with -9.6 kcal/mol, -9.5 kcal/mol and -9.4 kcal/mol, respectively (Table 1). Ergosterol peroxide was chosen instead of lupeol with binding affinity -9.5 kcal/mol since lupeol had lack of hydrogen bond in the docking result. The three selected compounds and DOX interacted with topoisomerase II α through various bonding interactions including hydrogen bonding and hydrophobic bonding (Figure 3A, B, C and D). However, electrostatic interaction was observed only between naringin and topoisomerase II α .

DOX formed three conventional hydrogen bonds with Arg727 with distances of 2.15, 2.18 and 3.03 Å as well as another conventional hydrogen bond with Arg673 (2.26Å) when docked with topoisomerase II α (Figure 3A and B). Both Arg727 and Arg673 are acted as hydrogen donors. Glu712 as hydrogen donor formed a carbon-hydrogen bond with DOX. There were three π -cationic interactions between DOX with Arg672 (4.08 and 3.98 Å) and Lys676 (4.72 Å), and two π -anionic interactions between DOX with Glu712 (4.23 and 4.86 Å). Hydrophobic bonding such as alkyl interaction with Leu829 and Val836 with distance of 4.42Å and 4.75Å, as well as π -alkyl interaction with Arg672 (5.04Å) and Lys676 (4.54Å) were observed. In this case both amino acids act as alkyls (Figure 3A and B).

For ergone, it formed strong conventional hydrogen bond with Gln542 with Lys550 with bond length of 2.64Å and distance of 2.33Å which was shorter than the conventional hydrogen bond created between ergosterol peroxide and topoisomerase II α . Both amino acids act as hydrogen donors. In the case of the docking of naringin with topoisomerase II α , naringin formed strong conventional hydrogen bond with Gln544 (2.19Å), Arg672 (2.03Å), Leu685 (2.98Å) and Asp671 (2.34Å) as well as carbon hydrogen bond with Pro593 (3.24Å). Other than that, naringin also formed π -cation interaction with Arg675 (3.88Å) which was not seen in other compounds (Figure 3C and D).

According to the data obtained, the binding affinity between DOX and topoisomerase II β (PDB ID: 4G0V, Figure 1D) was -5.1 kcal/mol. The compounds of mushroom; antrocin, ergosterol peroxide and naringin were showed better binding affinity than NRT, which was -6.0 kcal/mol, -5.8 kcal/mol and -5.7 kcal/mol (Table 1). All these three compounds and DOX interacted with topoisomerase II β with various bonding interactions including hydrogen bonding and hydrophobic bonding, however naringin is only involved in hydrogen bonding.

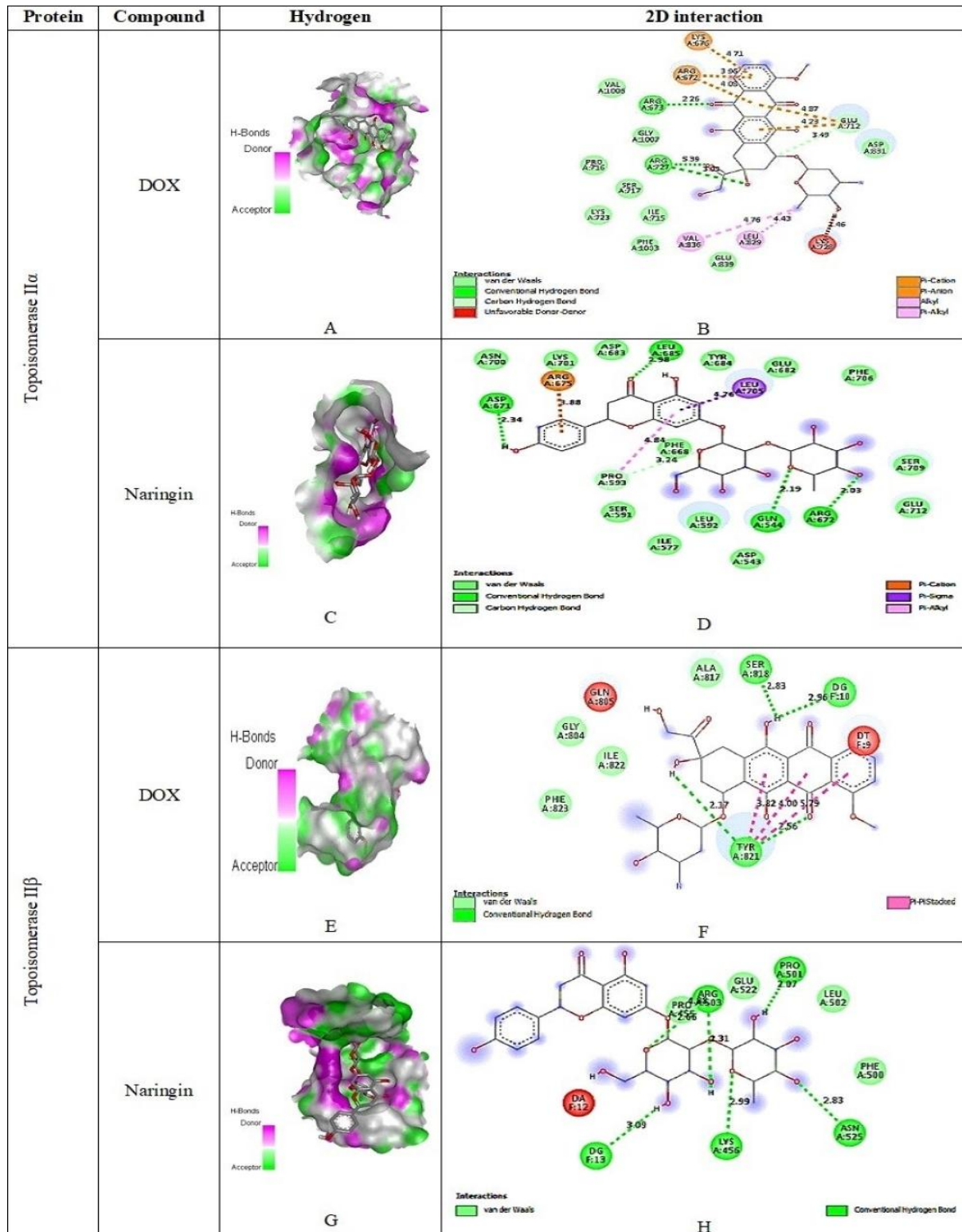


Figure 3. A) Docking pose of DOX on hydrogen bonding surface of topoisomerase II α , B) 2D interaction of DOX with topoisomerase II α , C) Docking pose of naringin on hydrogen bonding surface of topoisomerase II α , D) 2D interaction of naringin with topoisomerase II α , E) Docking pose of DOX on hydrogen bonding surface of topoisomerase II β , F) 2D interaction of DOX with topoisomerase II β , G) Docking pose of naringin on hydrogen bonding surface of topoisomerase II β , H) 2D interaction of naringin with topoisomerase II β . DOX – Doxorubicin

During the interaction of DOX with topoisomerase II β , DOX formed strong conventional hydrogen bond with Ser818 with bond length of 2.83 Å, Tyr821 with 2.55 and 2.17 Å distance, with Dg10 at distance 2.96Å. DOX also showed three π - π stacked bonds with Tyr821 with 3.82, 4.0, and 5.78Å distance (Figure 3E and F). For antrocin, strong conventional hydrogen bond was observed with Asn525 with 2.68Å distance and it is a hydrogen donor. Antrocin also formed π -alkyl interaction with Phe500 with bond length of 5.48Å. When ergosterol peroxide was docked with topoisomerase II β , it formed a strong conventional hydrogen bond with Dc11 which was a hydrogen acceptor with 3.01Å distance. Tyr821 had π -sigma interaction and π -alkyl interaction with ergosterol peroxide with distance of 3.49Å and 5.10Å respectively. On the other hand, based on the 2D interaction diagram of ergosterol peroxide with topoisomerase II β , three unfavorable bonds at Ser818, DNA residue Dt9 and Dg10 were observed.

Naringin owned the greatest number of hydrogen bonds with topoisomerase II β which were Arg503 (2.45Å, 2.66Å, 2.94Å and 2.31Å), Lys456 (2.99Å), Asn525 (2.83Å), Pro501 (2.07Å) and Dg13 (3.09Å). However, Figure 3G and H shows two conventional hydrogen bonds with Arg503 for 4.88Å and 2.66Å distance. There was one unfavorable bond with Da12 shown in 2D interaction diagram of ergosterol peroxide with topoisomerase II β . Antrocin and naringin did not show any similarity in interactions with topoisomerase II β as DOX, but ergosterol peroxide formed hydrophobic interaction with tyr821 of topoisomerase II β as DOX.

Molecular Dynamic Simulation

Molecular dynamic simulation is a technique to simulate both the protein and ligand for certain time to analyze the conformation changes [35]. The trajectories acquired from MD simulations provide useful data to study the interactions between proteins and ligands. For 100 ns at 300°K [36,37], MD simulations of naringin with EGFR, HER2, topoisomerase II α and topoisomerase II β enzymes of breast cancer were carried out. The root means square deviation (RMSD) [38,39], root means square fluctuation (RMSF) [40], radius of gyration (Rg) [41,42] of apo and complex proteins were determined and compared.

MD simulations were performed for EGFR, HER2, topoisomerase II α and topoisomerase II β . The MD results of RMSD, RMSF, radius of gyration (Rg), number of hydrogen bonds in protein and protein-naringin complex, and number of hydrogen bonds between protein and naringin against EGFR and HER2 are shown in figure 4A-4J, and against topoisomerase II α and topoisomerase II β are shown in figure 5A-5J. MM-PBSA binding free energy of naringin complex of EGFR, HER2, topoisomerase II α and topoisomerase II β are given in Table 2.

Figure 4A clearly indicates that the naringin-EGFR complex had a lower RMSD value than the EGFR alone, demonstrating the conformational stability of the EGFR in the presence of naringin at the active site. After 40 ns, the EGFR apo form reached equilibrium, and at 3.2 Å the EGFR reached a stable conformation. After settling and converging at 2.8 Å, the RMSD trajectory of the naringin-EGFR complex became steady after 20 ns. It has been observed that when naringin is bound, the RMSD values decrease slightly. This suggests that naringin binds tightly to EGFR and may inhibit it. Furthermore, naringin had constant fluctuations in EGFR's active pocket with an average RMSD of 4.5 Å. In RMSF studies, it was observed that a high flexibility scale for residues (725–760) of EGFR and this flexibility is due to this domain not possessing any ligands. The most residue fluctuation was observed for EGFR in the residue range 800-900 with average RMSF 1.8 Å (Figure 4B). It suggests that this domain adopted a specific conformation to accommodate naringin. EGFR and EGFR-naringin showed average Rg values of 1.93 nm and 1.99 nm, respectively (Figure 4C). Because of the binding of naringin, the complex has looser packed than EGFR, and it may be due to EGFR unfolding. Naringin did not affect the interprotein hydrogen bonding in EGFR (Figure 4D). Figure 4E depicts the results of the quantity and persistence of hydrogen bonds in the naringin-EGFR complex. Five hydrogen bonds were discovered in naringin-EGFR, and it was also supported by the results of molecular docking.

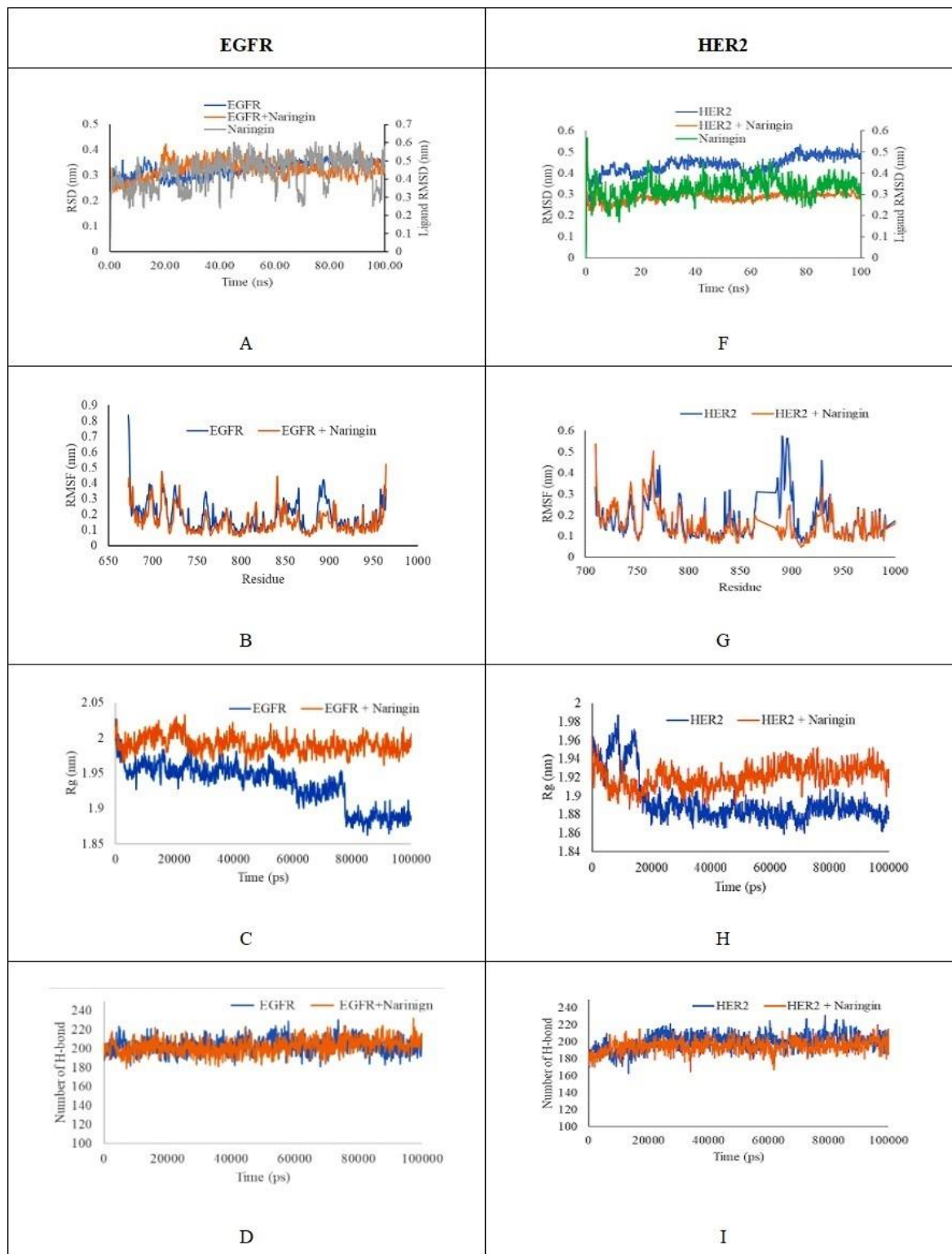


Figure 4. Molecular dynamic simulations: A) RMSD analysis of EGFR and naringin-EGFR, B) RMSF analysis of EGFR and naringin-EGFR, C) Radius of Gyration of EGFR and naringin-EGFR, D) H-Bond analysis of EGFR and naringin-EGFR, E) Lig H-Bond analysis of naringin-EGFR, F) RMSD analysis of HER2 and naringin-HER2, G) RMSF analysis of HER2 and naringin-HER2, H) Radius of Gyration of HER2 and naringin-HER2, I) H-Bond analysis of HER2 and naringin-HER2, J) Lig H-Bond analysis of naringin-HER2

The apo form of HER2 got equilibrium after 78 ns whereas and naringin complex got equilibrium after 15 ns, and the apo form of HER2 reached a stable conformation with RMSD of 5.0 Å and the complex of naringin-HER2 with RMSD of 2.9 Å that exhibited the conformational stability of the HER2 in the presence of naringin at the active site (Figure 4F). It has been observed that when naringin is bound, the RMSD values got decreased. This suggests that naringin binds tightly to HER2 and may inhibit it. Furthermore, naringin was discovered to fluctuate constantly in the active pocket of HER2 with an average RMSD of 3.2 Å. This suggests that naringin had acquired many conformations to bind tightly with HER2 and may inhibit it. In RMSF studies, it was detected that a high flexibility scale for residues (870–940) of HER2 and this flexibility may be the ligand does not possess any contact with this domain of the protein, which indicates that these sites are not stable. The most residue fluctuation was observed for EGFR in the residue range 750-860 with average RMSF 1.3 Å (Figure 4G). It confirms that this domain accommodates naringin with by possessing specific conformations. HER2 and HER2-naringin showed average Rg values of 1.88 nm and 1.93 nm, respectively (Figure 4H). Because of the binding of naringin, the complex has looser packed than HER2, and it may be due to HER2 unfolding. Both HER2 and HER2-naringin complex showed the same type of hydrogen bonding in HER2 suggested that naringin did not have any effect on the interprotein hydrogen bonding in HER2 (Figure 4I). Figure 4J illustrates the results of the quantity and persistence of hydrogen bonds in the naringin-HER2 complex. Five hydrogen bonds were found in naringin-HER2, and it was also supported by the results of molecular docking.

Figure 5A clearly indicates that the naringin-topoisomerase II α complex had a lower RMSD value than the topoisomerase II α alone, demonstrating the conformational stability of the topoisomerase II α in the presence of naringin at the active site. After 15 ns, the topoisomerase II α apo form reached equilibrium, and at 8.0 Å the topoisomerase II α reached a stable conformation. After settling and converging at 4.5 Å, the RMSD trajectory of the naringin-topoisomerase II α complex became steady after 10 ns. It has been observed that when naringin is bound, the RMSD values decrease slightly. This suggests that naringin binds tightly to topoisomerase II α and may inhibit it. But after 60 ns there was a slight increase in RMSD, indicates the binding instability of the complex. Furthermore, naringin had constant fluctuations in topoisomerase II α active pocket with an average RMSD of 8.2 Å. In RMSF studies, it was observed that residue fluctuation was observed for topoisomerase II α in the residue range 500-750 with average RMSF 3.3 Å (Figure 5B). It suggests that this domain adopted a specific conformation to accommodate naringin. Topoisomerase II α and topoisomerase II α -naringin showed average Rg values of 3.12 nm and 3.25 nm, respectively (Figure 5C). Because of the binding of naringin, the complex has looser packed than topoisomerase II α , and it may be due to topoisomerase II α unfolding. Naringin did not affect the interprotein hydrogen bonding in topoisomerase II α (Figure 5D). Figure 5E depicts the results of the quantity and persistence of hydrogen bonds in naringin-topoisomerase II α complex. Five hydrogen bonds were discovered in naringin-topoisomerase II α , and it was also supported by the results of molecular docking.

Figure 5F clearly indicates that the naringin-topoisomerase II β complex had a lower RMSD value than the topoisomerase II β alone, demonstrating the conformational stability of the topoisomerase II β in the presence of naringin at the active site. After 10 ns, the topoisomerase II β apo form reached equilibrium, and at 8.3 Å the topoisomerase II β reached a stable conformation. After settling and converging at 6.2 Å, the RMSD trajectory of the naringin-topoisomerase II β complex became steady after 10 ns. It has been observed that when naringin is bound, the RMSD values got decreased. This suggests that naringin binds tightly to topoisomerase II β and may inhibit it. Furthermore, naringin had constant fluctuations in topoisomerase II β active pocket with an average RMSD of 9.8 Å. In RMSF studies, it was observed that residue fluctuation was observed for topoisomerase II β in the residue range 450-525 with average RMSF 2.5 Å (Figure 5G). It suggests that this domain adopted a specific conformation to accommodate naringin. Topoisomerase II β and topoisomerase II β -naringin showed average Rg values of 3.32 nm and 3.08 nm, respectively (Figure 5H). Because of the binding of naringin, the complex has tighter packing than topoisomerase II β , and it may be due to topoisomerase II β folding. Naringin did not affect the interprotein hydrogen bonding in topoisomerase II β (Figure 5I).

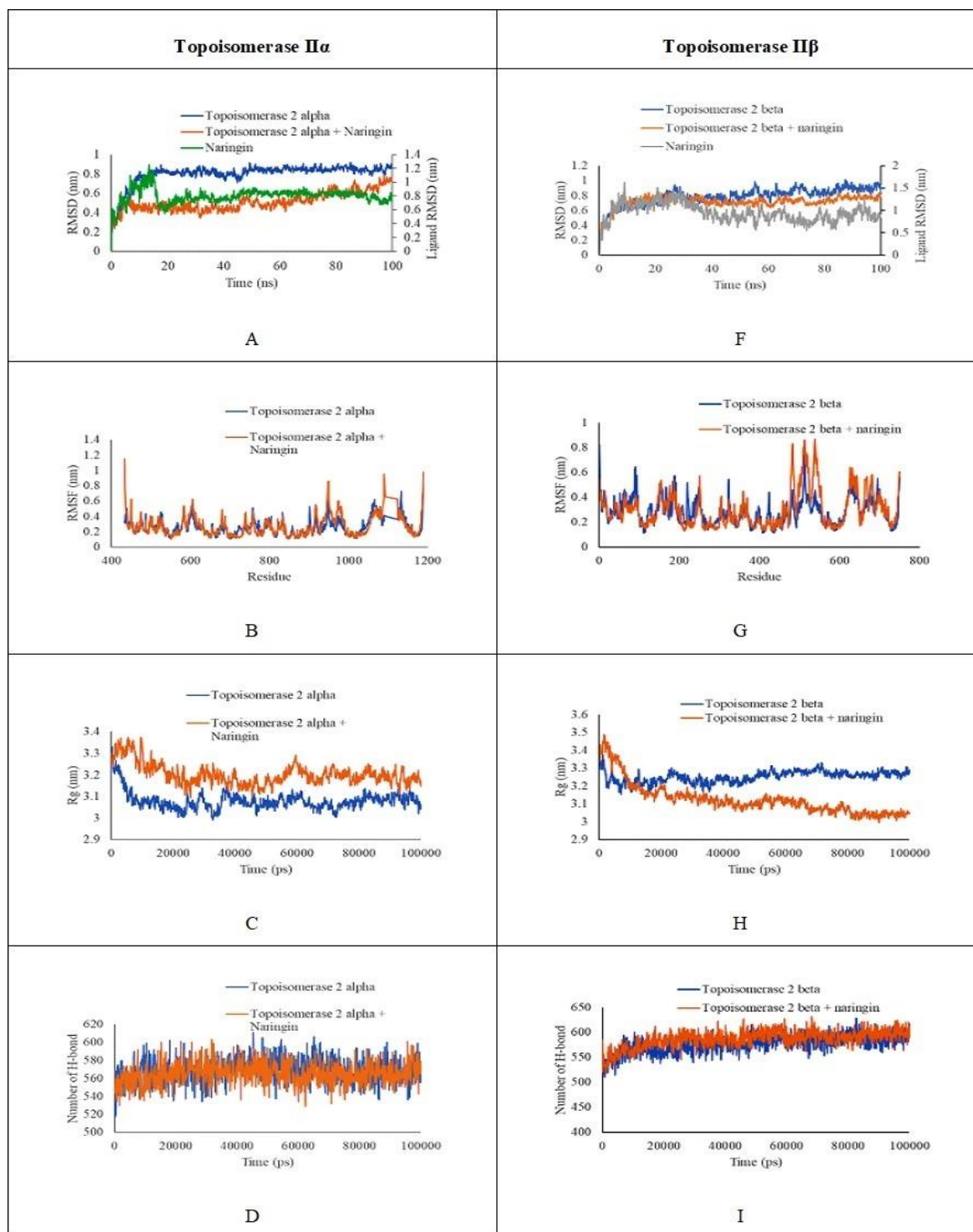


Figure 5. Molecular dynamic simulations: A) RMSD analysis of topoisomerase II α and naringin-topoisomerase II α , B) RMSF analysis of topoisomerase II α and naringin-topoisomerase II α , C) Radius of Gyration of topoisomerase II α and naringin-topoisomerase II α , D) H-Bond analysis of topoisomerase II α and naringin-topoisomerase II α , E) Lig H-Bond analysis of naringin-topoisomerase II α , F) RMSD analysis of topoisomerase II β and naringin-topoisomerase II β , G) RMSF analysis of topoisomerase II β and naringin-topoisomerase II β , H) Radius of Gyration of topoisomerase II β and naringin-topoisomerase II β , I) H-Bond analysis of topoisomerase II β and naringin-topoisomerase II β , J) Lig H-Bond analysis of naringin-topoisomerase II β

The anchoring of the ligand to the protein becomes tighter as the number of hydrogen bonds increases and the length of each hydrogen bond shortens. Figure 5J depicts the results of the quantity and persistence of hydrogen bonds in naringin-topoisomerase II β complex. Five hydrogen bonds were discovered in naringin-topoisomerase II β , and it was also supported by the results of molecular docking.

Residual binding analysis is one of the key processes in structure-based drug design to identify the important residues involved in the ligand-protein binding. In residual analysis, it was noted that the hydrophobic and acidic residues in all the four used proteins made a significant impact. The results of the current investigation suggest that hydrophobic interactions between the cancer protein and naringin complexes are the primary means by which they are stabilized. The residual energy value of amino acid residues of EGFR, HER2, topoisomerase II α and topoisomerase II β when these are bound with naringin are shown in Figure 1A, 1B, 1C and 1D, respectively. The key residues and their critical role in ligand binding were identified based on the contribution energy. The residual energy analysis showed that most of the residues in all four protein complexes with naringin contributed negatively. Specifically, active site residues Leu694, Val702, Ala719, Met742, Cys751, Leu764, Leu768, Pro770, Leu820, and Thr830 showed a higher contribution energy in naringin complex with EGFR however in HER2 Val734, Ala751, Met774, Leu785, Leu796, Thr798, Leu852, and Phe864 showed higher contribution energy. Active site residues Phe680, Pro681, Ile704, Leu705, Glu712, Tyr830, Glu837, and Asp1004 of topoisomerase II α complex with naringin has shown higher contribution energy, whereas Lys1, Pro4, Phe49, Pro50, Ile75, and Ile78 are recognized as crucial residues necessary for the activity of topoisomerase II β .

All the examined proteins' naringin complexes (last 20 ns MD trajectories) under-went MMPBSA study to determine the van der Waals and electrostatic interactions, polar solvation, and SASA energy related with binding free energy. Table 2 comprises the binding free energy information. The strength of the binding interactions between the ligand and the target protein is measured by the ligand binding affinity, which is directly related to ligand potency. Additionally, free energy is negative for advantageous interactions. Naringin can be a possible lead for inhibiting EGFR, HER2, topoisomerase II α and topoisomerase II β proteins according to MM-PBSA study, with binding free energies of -196.947, -238.847, -253.092 and -195.663 kJ mol⁻¹, respectively. Van der Waals, electro-static, polar solvation, and SASA energy were additional energy terms that added up to yield the binding free energy.

Table 2. MM-PBSA binding free energy of naringin complex of EGFR, HER2, topoisomerase II α and topoisomerase II β

Complex	van der Waal energy (kJ mol ⁻¹)	Electrostatic energy (kJ mol ⁻¹)	Polar solvation energy (kJ mol ⁻¹)	SASA energy (kJ mol ⁻¹)	Total binding energy (kJ mol ⁻¹)
EGFR + Naringin	-266.406 ± 18.128	-23.285 ± 8.123	115.923 ± 24.447	-23.180 ± 1.675	-196.947 ± 19.378
HER2 + Naringin	-309.133 ± 13.624	-31.821 ± 4.533	127.725 ± 12.885	-25.618 ± 1.535	-238.847 ± 18.402
Topoisomerase II α + Naringin	-331.847 ± 11.732	-25.469 ± 12.573	130.018 ± 29.765	-25.794 ± 0.849	-253.092 ± 24.664
Topoisomerase II β + Naringin	-235.242 ± 23.974	-18.101 ± 9.562	78.326 ± 21.473	-20.646 ± 1.224	-195.663 ± 26.572

ADME and Toxicity Prediction of Phytochemicals Mushroom

Drug likeness, pharmacokinetic and toxicity profile are tabulated in Table 3 and 4. A drug candidate's ability to perform well in clinical trials depends on its ability to absorb, distribute, metabolize, and eliminate. Lipinski's rule of five states that an orally active medicine must have all five of the following characteristics: (i) hydrogen bond donors < 5; (ii) hydrogen bond acceptors < 10; (iii) molecular masses < 500 g/mol; and (iv) log P values less < 5 [43-45]. The pharmacokinetic characteristics of mushroom phytochemicals are displayed in Table 3. All the examined molecules,

except for a few compounds, adhere to the Lipinski rule of 5. The compound with the better binding affinity with all the four selected enzymes, naringin, however do not comply with the molecular weight, number of hydrogen bond acceptors and donors according to Lipinski rule of 5, has a medium BBB permeability, and a low clearance with score of < 5 ml/min/kg, suggesting that it may not be the best oral medication to treat breast cancer. Moreover, CYP450 2C19 substrate (non-substrate) value for naringin had a probability of 0.876; CYP450 2C19 inhibitor (non-inhibitor) had a probability of 0.986.

Table 3. Drug likeness and pharmacokinetic properties of phytochemicals of mushroom

Compounds	MW	logP	HBA	HBD	RB	TPSA	Clearance	BBB permeant	CYP2C19-inh	CYP2C19-sub
2,3,6,23-Tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid	504.35	3.203	6	5	2	118.22	3.089	0.362	0.003	0.898
Antcin-A	454.31	4.581	4	1	5	71.44	15.212	0.835	0.016	0.904
Antrocin	234.16	3.667	2	0	0	26.3	10.143	0.9	0.329	0.853
Antroquinonol	390.28	6.933	4	2	11	58.92	6.455	0.078	0.467	0.887
Beta-D-glucan	504.17	-4.064	16	11	7	268.68	0.794	0.421	0.002	0.049
Colosolactone G	538.29	4.305	7	1	4	99.13	4.003	0.829	0.296	0.85
Cordycepin	251.1	-1.892	8	4	2	120.04	7.546	0.63	0.04	0.064
Ellagic acid	302.01	1.117	8	4	0	141.34	2.346	0.011	0.013	0.043
Ergone	392.31	6.157	1	0	4	17.07	2.548	0.009	0.29	0.967
Ergosterol peroxide	428.33	5.601	3	1	4	38.69	5.081	0.693	0.079	0.967
Ergosterol	396.34	5.952	1	1	4	20.23	1.97	0.861	0.051	0.974
Fomitoid K	674.44	4.461	9	4	11	142.75	2.132	0.06	0.003	0.89
Formipinoside	646.41	4.463	9	4	13	142.75	6.94	0.033	0.009	0.889
Gallic acid	170.02	0.645	5	4	1	97.99	10.108	0.099	0.026	0.039
Ganoderic acid F	512.28	2.594	7	1	6	122.65	12.787	0.937	0.025	0.907
Ganoderiol A	474.37	4.745	4	4	6	80.92	13.969	0.52	0.015	0.949
Ganodermanontriol	472.36	4.527	4	3	6	77.76	12.241	0.683	0.026	0.961
Ganomycin B	344.2	4.283	4	3	9	77.76	6.359	0.043	0.098	0.061
Grifolin	328.24	6.676	2	2	8	40.46	7.291	0.031	0.786	0.194
Hispidin	246.05	2.093	5	3	2	90.9	14.912	0.018	0.047	0.05
Hispolon	220.07	1.126	4	2	4	74.6	17.69	0.066	0.077	0.063
Ibotenic acid	158.03	-2.923	6	4	2	109.32	3.009	0.643	0.067	0.049
Illudin S	264.14	0.248	4	3	1	77.76	1.796	0.424	0.028	0.873
Inonotic acid A	270.18	1.716	4	3	5	77.76	6.567	0.786	0.014	0.272
L-Theanine	174.1	-3.109	5	4	6	92.42	5.609	0.897	0.055	0.054
Lucialdehyde A	438.35	6.138	2	1	5	37.3	6.969	0.133	0.177	0.963
Lucialdehyde B	452.33	5.136	3	0	5	51.21	7.394	0.061	0.386	0.963
Lucialdehyde C	454.34	5.311	3	1	5	54.37	9.115	0.127	0.269	0.954
Lucidadiol	456.36	5.351	3	2	5	57.53	10.902	0.384	0.121	0.949
Lucidenic acid A	458.27	2.594	6	1	4	105.58	17.353	0.651	0.009	0.942
Lucidenic acid C	476.28	2.198	7	3	4	128.97	8.818	0.662	0.003	0.82
Lucidenic acid D	514.26	2.574	8	1	6	131.88	4.62	0.739	0.024	0.879
Lucidenic acid E	516.27	2.819	8	2	6	135.04	5.833	0.741	0.015	0.824
Lucidenic acid N	460.28	2.792	6	2	4	108.74	19.628	0.575	0.005	0.909
Lucidumol B	458.38	5.321	3	3	5	60.69	10.519	0.557	0.028	0.962
Lupeol	426.39	7.291	1	1	1	20.23	17.929	0.792	0.055	0.969
Naringin	580.18	-0.493	14	8	6	225.06	1.489	0.347	0.014	0.124
Panepoxydone	210.09	2.332	4	3	3	73.22	10.311	0.037	0.043	0.58
Psilocybine	284.09	-0.701	6	2	5	82.63	3.65	0.963	0.041	0.067
Vulpinic acid	322.08	3.196	5	0	4	69.67	6.777	0.803	0.902	0.294

HBA – Hydrogen bond acceptor, HBD – Hydrogen bond donor, RB – Rotatable bond, TPSA – Total polar surface area

But like few FDA approved cancer drugs such as doxorubicin and paclitaxel with high-molecular weight (546.536Da, 800+Da), hydrogen bond donor (6.4) and acceptor (12.15), and total polar surface area (206.221), naringin which is having high-molecular weight, hydrogen bond donor and acceptors with large total polar surface area could be used as parenteral drug. Otherwise, must do some structural modification in the naringin molecule such as reduce the number of hydrogen bond acceptor count, hydrogen bond donor count and molecular weight of naringin but without any compromising on molecular interaction of naringin with cancer enzymes, to improve its ADMET properties.

Table 4. Toxicity profile of phytochemicals of mushroom

Compounds	Toxicity				
	Rat Oral Acute Toxicity	Hepato-Toxicity	Carcino-Genecity	Respiratory Toxicity	Muta-Genecity
2,3,6,23-Tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid	0.359	0.198	0.037	0.522	0
Antcin-A	0.889	0.316	0.067	0.486	0
Antrocin	0.266	0.142	0.398	0.880	0
Antroquinol	0.051	0.237	0.025	0.033	0
Beta-D-glucan	0.108	0.080	0.008	0.005	0
Colossolactone G	0.206	0.312	0.348	0.488	1
Cordycepin	0.577	0.913	0.139	0.941	0
Ellagic acid	0.450	0.144	0.314	0.067	4
Ergone	0.419	0.187	0.373	0.945	1
Ergosterol peroxide	0.986	0.584	0.064	0.975	0
Ergosterol	0.944	0.094	0.046	0.921	0
Fomitoside K	0.127	0.205	0.021	0.377	0
Formipinoside	0.106	0.526	0.075	0.100	0
Gallic acid	0.030	0.433	0.024	0.381	0
Ganoderic acid F	0.196	0.089	0.041	0.878	1
Ganoderiol A	0.044	0.605	0.041	0.967	0
Ganodermanontriol	0.068	0.605	0.345	0.973	0
Ganomycin B	0.211	0.832	0.609	0.699	0
Grifolin	0.005	0.461	0.024	0.123	0
Hispidin	0.211	0.229	0.594	0.292	0
Hispolon	0.906	0.213	0.590	0.949	1
Ibotenic acid	0.913	0.277	0.589	0.946	0
Illudin S	0.726	0.730	0.842	0.946	1
Inonotic acid A	0.055	0.211	0.032	0.072	0
L-Theanine	0.018	0.029	0.016	0.060	0
Lucialdehyde A	0.034	0.566	0.129	0.977	1
Lucialdehyde B	0.059	0.269	0.201	0.965	2
Lucialdehyde C	0.045	0.183	0.033	0.968	2
Lucidadiol	0.058	0.225	0.014	0.978	2
Lucidenic acid A	0.870	0.153	0.069	0.510	0
Lucidenic acid C	0.952	0.241	0.019	0.909	0
Lucidenic acid D	0.163	0.093	0.058	0.749	1
Lucidenic acid E	0.119	0.151	0.033	0.785	1
Lucidenic acid N	0.899	0.226	0.023	0.320	0
Lucidumol B	0.045	0.586	0.048	0.971	0
Lupeol	0.195	0.191	0.009	0.800	0
Naringin	0.245	0.103	0.795	0.033	0
Panepoxydone	0.983	0.028	0.448	0.694	0
Psilocybine	0.237	0.652	0.191	0.732	0
Vulpinic acid	0.497	0.902	0.071	0.332	1

Computational approaches for assessing and estimating the toxicity of natural bioactive chemicals are regarded as a valuable validation tool since they provide a thorough grasp of toxicogenomic. The toxicity prediction study indicates that 10 of the mushroom derived compounds are having high probability ($p > 0.5$) for rat oral acute toxicity, 10 compounds have high probability ($p > 0.5$) for hepatotoxicity, 6 compounds have high probability ($p > 0.5$) for carcinogenicity, 25 compounds have high probability ($p > 0.5$) for respiratory toxicity, and 16 compounds have high probability for mutagenicity (Table 4). However, naringin has 0.245, 0.103, 0.033 and 0 probability for rat oral acute toxicity, hepatotoxicity, carcinogenicity, and mutagenicity, respectively. Even though, naringin has 0.795 probabilities for respiratory toxicity. This can be reduced by modifying the responsible functional group in naringin without affecting the anticancer activity.

The interaction of NRT, DOX and 40 phytochemicals from mushrooms with several breast cancer enzymes such as EGFR, HER2, topoisomerase II α and topoisomerase II β was investigated in this *in-silico* study. From the results, it was found that antcin-A, ergosterol peroxide and naringin were showing better binding affinity towards breast cancer proteins than the standard drug, NRT and DOX. Among all the phytocompounds of mushroom, naringin showed high binding affinity towards every breast cancer protein. Naringin exhibited optimal interactions such as more hydrogen bonding and reported the same interacted amino acids as NRT and DOX. Further the *in-silico* ADMET studies also confirmed that naringin has a low toxicity profile, but it fails to fulfill few criteria such as a greater number of hydrogen bond acceptor count, total polar surface area, molecular weight, and hydrogen bond donor count. Naringin can be ad-administered as parental dosage form as how the FDA approved drugs paclitaxel and doxorubicin, which are also not fulfilling four out of five Lipinski criteria for oral better oral absorption. The molecular dynamic studies confirmed the stability of the molecular interaction complex of naringin with the breast cancer proteins. Hence, naringin could be suggested as the best ligand for the development of breast cancer multiple target protein inhibitors with antiviral activity. However, additional *in vitro*, preclinical, and clinical investigations are required to prove naringin's true anti-breast cancer effectiveness.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to AIMST University for providing the necessary facilities to carry out this work. Author also extends thanks to Webgro online tool service for MD studies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: R.V.; Design: R.V., R.S.; Control: R.V., R.S.; Sources: H.R., P.P., P.T.; Materials: P.P.; Data Collection and/or Processing: H.R., P.P., P.T.; Analysis and/or Interpretation: R.V., R.S., P.P., P.T.; Literature Review: P.T.; Manuscript Writing: R.V., R.S., H.R., P.P., P.T.; Critical Reviews: R.V., R.S., H.R., P.P., P.T.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

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

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

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

REFERENCES

1. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. [\[CrossRef\]](#)
2. Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 66. [\[CrossRef\]](#)

3. Tomao, F., Papa, A., Zaccarelli, E., Rossi, L., Caruso, D., Minozzi, M., Vici, P., Frati, L., Tomao, S. (2015). Triple-negative breast cancer: New perspectives for targeted therapies. *Onco Targets and Therapy*, 177-193. [\[CrossRef\]](#)
4. Marusyk, A., Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: Causes and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1805(1), 105-117. [\[CrossRef\]](#)
5. Wang, N., Wang, Z.Y., Mo, S.L., Loo, T.Y., Wang, D.M., Luo, H.B., Yang, D.P., Chen, Y.L., Shen, J.G., Chen, J.P. (2012). Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 134, 943-955. [\[CrossRef\]](#)
6. Chen, S., Huang, L., Liu, Y., Chen, C.M., Wu, J., Shao, Z.M. (2013). The predictive and prognostic significance of pre-and post-treatment topoisomerase II α in anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy for local advanced breast cancer. *European Journal of Surgical Oncology*, 39(6), 619-626. [\[CrossRef\]](#)
7. Koren, R., Rath-Wolfson, L., Ram, E., Itzhac, O.B., Schachter, B., Klein, B., Gal, R., Dreznik, Z. (2004). Prognostic value of topoisomerase II in female breast cancer. *Oncology Reports*. 12(4), 915-919. [\[CrossRef\]](#)
8. Jang, J.Y., Kim, D., Kim, N.D. (2023). Recent developments in combination chemotherapy for colorectal and breast cancers with topoisomerase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8457. [\[CrossRef\]](#)
9. Vanderbeeken, M.C., Aftimos, P.G., Awada, A. (2013). Topoisomerase inhibitors in metastatic breast cancer: Overview of current practice and future development. *Current Breast Cancer Reports*, 5(1), 31-41. [\[CrossRef\]](#)
10. Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 177. [\[CrossRef\]](#)
11. Debnath, S., Sen, D. (2022). Mushrooms are potential foods against cancer: Identified by molecular docking and molecular dynamics simulation. *Natural Product Research*, 36(10), 2604-2609. [\[CrossRef\]](#)
12. Speck-Planche, A., Cordeiro, M.N.D.S. (2017). Fragment-based *in-silico* modeling of multi-target inhibitors against breast cancer-related proteins. *Molecular Diversity*, 21, 511-523. [\[CrossRef\]](#)
13. Sert, Y., Albayati, M.R., Şen, F., Dege, N. (2024). The DFT and *in-silico* analysis of 2,2'-((1e,1'e)-((3,3'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4,4'diyl)bis(azanylylidene))bis(methanylylidene)diphenol molecule. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 687, 133444. [\[CrossRef\]](#)
14. Mahmudov, I., Demir, Y., Sert, Y., Abdullayev, Y., Sujayev, A., Alwasel, S.H., Gulcin, I. (2022). Synthesis and inhibition profiles of *N*-benzyl- and *N*-allyl aniline derivatives against carbonic anhydrase and acetylcholinesterase-A molecular docking study. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(3), 103645. [\[CrossRef\]](#)
15. Patel, S., Goyal, A. (2012). Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: A review. *3 Biotech*, 2, 1-5. [\[CrossRef\]](#)
16. Blagodatski, A., Yatsunskaya, M., Mikhailova, V., Tiasto, V., Kagansky, A., Katanaev, V.L. (2018). Medicinal mushrooms as an attractive new source of natural compounds for future cancer therapy. *Oncotarget*, 9(49), 29259. [\[CrossRef\]](#)
17. Ozturk, M., Tel-Çayan, G., Muhammad, A., Terzioğlu, P., Duru, M.E. (2015). Mushrooms: A Source Of Exciting Bioactive Compounds. In: Atta-ur-Rahman (eds). *Studies in Natural Products Chemistry*, (pp. 363-456). Amsterdam: Elsevier. [\[CrossRef\]](#)
18. Shin, A., Kim, J., Lim, S.Y., Kim, G., Sung, M.K., Lee, E.S., Ro, J. (2010). Dietary mushroom intake and the risk of breast cancer based on hormone receptor status. *Nutrition and Cancer*, 62(4), 476-483. [\[CrossRef\]](#)
19. Vamanu, E. (2018). Bioactive capacity of some Romanian wild edible mushrooms consumed mainly by local communities. *Natural Product Research*, 32(4), 440-443. [\[CrossRef\]](#)
20. Vascellari, S., Zucca, P., Perra, D., Serra, A., Piras, A., Rescigno, A. (2021). Antiproliferative and antiviral activity of methanolic extracts from Sardinian Maltese Mushroom (*Cynomorium coccineum* L.). *Natural Product Research*, 35(17), 2967-2971. [\[CrossRef\]](#)
21. Muszyńska, B., Kała, K., Sułkowska-Ziaja, K. (2017). Edible mushrooms and their *in vitro* culture as a source of anticancer compounds. In: S. Malik, (eds), *Biotechnology and Production of Anti-Cancer Compounds*, (pp. 231-251). Cham: Springer. [\[CrossRef\]](#)
22. Hao, Y.F., Jiang, J.G. (2015). Origin and evolution of China Pharmacopoeia and its implication for traditional medicines. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 15(7), 595-603. [\[CrossRef\]](#)
23. Veerasamy, R., Karunakaran, R. (2022). Molecular docking unveils the potential of andrographolide derivatives against COVID-19: An *in-silico* approach. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 1-6. [\[CrossRef\]](#)

24. Mun, C.S., Hui, L.Y., Sing, L.C., Karunakaran, R., Ravichandran, V. (2022). Multi-targeted molecular docking, pharmacokinetics, and drug-likeness evaluation of coumarin based compounds targeting proteins involved in development of COVID-19. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(12), 103458. [\[CrossRef\]](#)
25. Hui, L.Y., Mun, C.S., Sing, L.C., Rajak, H., Karunakaran, R., Ravichandran, V. (2023). Multi-targeted molecular docking and drug-likeness evaluation of some nitrogen heterocyclic compounds targeting proteins involved in the development of COVID-19. *Medicinal Chemistry*, 19(3), 297-309. [\[CrossRef\]](#)
26. Kalimuthu, A.K., Panneerselvam, T., Pavadai, P., Pandian, S.R., Sundar, K., Murugesan, S., Ammunje, D.N., Kumar, S., Arunachalam, S., Kunjiappan, S. (2021). Pharmacoinformatics-based investigation of bioactive compounds of Rasam (South Indian recipe) against human cancer. *Scientific Reports*, 11(1), 21488. [\[CrossRef\]](#)
27. Tumskiy, R.S., Tumskaya, A.V. (2021). Multistep rational molecular design and combined docking for discovery of novel classes of inhibitors of SARS-CoV-2 main protease 3CLpro. *Chemical Physics Letters*, 780, 138894. [\[CrossRef\]](#)
28. Vishvakarma, V.K., Singh, M.B., Jain, P., Kumari, K., Singh, P. (2022). Hunting the main protease of SARS-CoV-2 by plitidepsin: Molecular docking and temperature-dependent molecular dynamics simulations. *Amino Acids*, 1-9. [\[CrossRef\]](#)
29. Schüttelkopf, A.W., Van Aalten, D.M. (2004). PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(8), 1355-63. [\[CrossRef\]](#)
30. Rangsinth, P., Sillapachaiyaporn, C., Nilkhet, S., Tencomnao, T., Ung, A.T., Chuchawankul, S. (2021). Mushroom-derived bioactive compounds potentially serve as the inhibitors of SARS-CoV-2 main protease: An *in-silico* approach. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 11(2), 158-172. [\[CrossRef\]](#)
31. Suwannarach, N., Kumla, J., Sujarit, K., Pattananandecha, T., Saenjum, C., Lumyong, S. (2020). Natural bioactive compounds from fungi as potential candidates for protease inhibitors and immunomodulators to apply for coronaviruses. *Molecules*, 25(8), 1800. [\[CrossRef\]](#)
32. Skok, Z., Zidar, N., Kikelj, D., Ilaš, J. (2019). Dual inhibitors of human DNA topoisomerase II and other cancer-related targets. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(3), 884-904. [\[CrossRef\]](#)
33. Feldinger, K., Kong, A. (2015). Profile of neratinib and its potential in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 147-162. [\[CrossRef\]](#)
34. Arthur, D.E. (2019). Molecular docking studies of some topoisomerase II inhibitors: Implications in designing of novel anticancer drugs. *Radiology of Infectious Diseases*, 6(2), 68-79. [\[CrossRef\]](#)
35. Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J.L., Dror, R.O., Shaw, D.E. (2010). Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(8), 1950-1958. [\[CrossRef\]](#)
36. Shukla, R., Tripathi, T. (2020). Molecular Dynamics Simulation of Protein and Protein-Ligand Complexes. In: D.B. Singh, (eds), *Computer-Aided Drug Design*, (pp.133-161). Singapore: Springer.
37. Chen, Z., Yi, J., Zhao, H., Luan, H., Xu, M., Zhang, L., Feng, D. (2021). Strength development and deterioration mechanisms of foamed asphalt cold recycled mixture based on MD simulation. *Construction and Building Materials*, 269, 121324. [\[CrossRef\]](#)
38. Aier, I., Varadwaj, P.K., Raj, U. (2016). Structural insights into conformational stability of both wild-type and mutant EZH2 receptor. *Scientific Reports*, 6(1), 34984. [\[CrossRef\]](#)
39. Schreiner, W., Karch, R., Knapp, B., Ilieva, N. (2012). Relaxation estimation of RMSD in molecular dynamics immunosimulations. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2012, 173521. [\[CrossRef\]](#)
40. Sargsyan, K., Grauffel, C., Lim, C. (2017). How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 13(4), 1518-1524. [\[CrossRef\]](#)
41. Justino, G.C., Nascimento, C.P., Justino, M.C. (2021). Molecular dynamics simulations and analysis for bioinformatics undergraduate students. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(4), 570-582. [\[CrossRef\]](#)
42. Zhu, J., Lv, Y., Han, X., Xu, D., Han, W. (2017). Understanding the differences of the ligand binding/unbinding pathways between phosphorylated and non-phosphorylated ARH1 using molecular dynamics simulations. *Scientific Reports*, 7(1), 12439. [\[CrossRef\]](#)
43. Egan, W.J., Merz, K.M., Baldwin, J.J. (2000). Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(21), 3867-3877. [\[CrossRef\]](#)
44. Ghose, A.K., Viswanadhan, V.N., Wendoloski, J.J. (1999). A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 1(1), 55-68. [\[CrossRef\]](#)

45. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 4-17. [\[CrossRef\]](#)



DESIGN, SYNTHESIS, AND EVALUATION OF ANTIBACTERIAL POTENTIAL OF HYDRAZONE-TETHERED PYRAZOLE-THIAZOLE DERIVATIVES

HİDRAZON BAĞLI PİRAZOL-TİYAZOL TÜREVLERİNİN TASARIMI, SENTEZİ VE ANTİBAKTERİYEL POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Burak KUZU^{1*}, Aybek YİĞİT², Fuat KARAKUŞ³

¹Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, 65080, Van, Türkiye

²Iğdır University, Tuzluca Vocational School, Department of Pharmacy Services, 76000, Iğdır, Türkiye

³Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology, 65080, Van, Türkiye

ABSTRACT

Objective: This study includes the investigation of the antimicrobial potential of a series of compounds designed by hybridization of thiazole, hydrazone and pyrazole systems identified as antimicrobial moieties in the literature. The aim was to filter the designed compounds with drugability parameters, synthesize the selected compounds and test their antibacterial potential in silico and in vitro.

Material and Method: The drugability properties of synthesized compounds were determined by online scanners and the potential effects of selected compounds on *E. coli* and *S. aureus* strains were determined by disk diffusion method. Also, Autodock 4.2 software was used to determine the inhibitory potential of compounds against the dihydrofolate reductase (DHFR) enzyme.

Result and Discussion: In our study, among the newly designed hydrazone-linked pyrazole-thiazole compounds, the compounds determined according to their drugability parameters (17a-c) were synthesized with high efficiency. Among the compounds tested for antibacterial activity, Compound 17c formed a zone diameter of 8 mm against *E. coli* strain and 9 mm against *S. aureus* strain at a concentration of 80 µg/ml. Also, compound 17c formed a zone diameter of 7 mm against *E. coli* strain and 8 mm against *S. aureus* strain at a concentration of 40 µg/ml. Furthermore, the ADMET profiles of the presented compounds indicate that they may have suitable drugability parameters as potential antibacterial agents.

Keywords: Antibacterial, hybridization, in silico, synthesis

ÖZ

Amaç: Bu çalışma, literatürdeki antimikrobiyal kısım olarak belirlenen tiyazol, hidrazon ve pirazol sistemlerinin hibridizasyonu ile tasarlanan bir seri bileşiğin antimikrobiyal etki potansiyelinin araştırılmasını içermektedir. Tasarlanan bileşiklerin ilaçlanabilirlik parametreleri ile filtrasyonu, seçilen bileşiklerin sentezi ve antibakteriyel etki potansiyelinin in silico ve in vitro test edilmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Sentezlenen bileşiklerin ilaçlanabilirlik özellikleri online tarayıcılar ile belirlenmiş ve en düşük toksisite profiline sahip bileşiklerin *E. coli* ve *S. aureus* şujlarındaki

* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Burak Kuzu
e-mail / e-posta: burakkuzu@yyu.edu.tr, Phone / Tel.: +905536313028

potansiyel etkisi disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca bileşiklerin dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimine karşı inhibisyon potansiyelini belirlemek için Autodock 4.2 yazılımı kullanılmıştır. **Sonuç ve Tartışma:** Çalışmamızda, yeni tasarlanan hidrazon bağlı pirazol-tiyazol bileşikleri arasında, ilaçlanabilirlik parametrelerine (17a-c) göre belirlenen bileşikler yüksek verimlilikle sentezlendi. Antibakteriyel aktivite için test edilen bileşikler arasında, Bileşik 17c, 80 µg/ml konsantrasyonunda *E. coli* suşuna karşı 8 mm ve *S. aureus* suşuna karşı 9 mm'lik bir zon çapı oluşturdu. Ayrıca, Bileşik 17c, 40 µg/ml konsantrasyonunda *E. coli* bakteri suşunda 7 mm'lik, *S. aureus* bakteri suşunda 8 mm'lik bir zon çapı oluşturdu. İlaveeten, sunulan bileşiklerin ADMET profilleri, bunların potansiyel antibakteriyel ajanlar olarak uygun ilaçlanabilirlik parametrelerine sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel, hibridizasyon, in siliko, sentez

INTRODUCTION

Nowadays, the increase in disease types and drug resistance limits the use of existing pharmaceuticals and thus reveals the need to develop new, fast, effective, and economical pharmaceuticals [1]. For this purpose, computer-aided drug design (CADD) provides a great advantage in terms of time and selectivity in discovering new drug candidates [2]. The support of structure-based drug design and ligand-based drug design strategies with *in silico* procedures and bioinformatics tools facilitates access to more effective, practical, economical, and reliable drug candidates [3,4]. In addition, it has been determined that the molecular hybridization technique, formed by combining the pharmacophoric regions of known drugs in the same molecule, is quite effective in developing new drug candidates with high selectivity and druggability potential [5].

Developing targeted drug candidates using drug design strategies is particularly important for creating new antimicrobial agents [6]. Because one of the major factors that threaten human health worldwide, especially in developing countries, is antibiotic resistance due to the abuse of antibiotics. If a solution cannot be found against this situation, it is estimated that 10 million people will lose their lives annually due to drug-resistant infections by 2050 [7]. This difficulty can be overcome by discovering new, selective, and reliable agents.

In recent drug candidate development studies, the thiazole ring is used as an important building block due to its strong and electron-rich structure [8]. It has been determined that various compounds containing the thiazole nucleus have various pharmaceutical activities, including anti-inflammatory, anticancer, antiviral, antidiabetic, and anticonvulsant properties [9]. It is no coincidence that the first effective antibiotics used, penicillins, cephalosporins with thiazole units, and sulfathiazole structures from the sulfonamide group of antibiotics contain a thiazole moiety (Figure 1) [10].

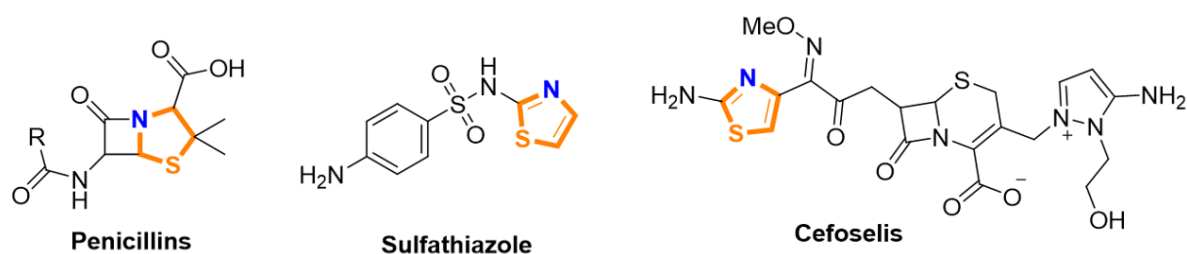


Figure 1. Antibacterial drugs containing thiazole moiety

Therefore, in this study we focused on agents containing thiazole groups, and interestingly, recent studies in the literature led us to the antimicrobial potential of thiazole-hydrazone derivatives. For example, a series of compounds (1) designed with a hydrazone bridge using molecular hybridization techniques of quinoline and thiazole groups have been reported to have antimicrobial activity via dihydrofolate reductase (DHFR) inhibition [11]. In another study, 2-pyridyl thiazole hydrazone derivatives (2) were determined to have highly effective antiprotozoal activity against *Trypanosoma cruzi* [12]. Similarly, coumarin-thiazole hydrazone derivatives (3) were determined to have

antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Candida albicans* species [13]. Additionally, several thiazole-hydrazone derivatives (4) were studied on clinically important fungi, and the compounds were found to have significant antifungal activity, particularly on *Candida* and *Cryptococcus* species and *Paracoccidioides brasiliensis* species [14]. Finally, 1,2,3-triazole-thiazole hydrazone hybrid derivatives (5) were reported as promising candidates as antibacterial, anti-candida, and anti-biofilm agents (Figure 2) [15].

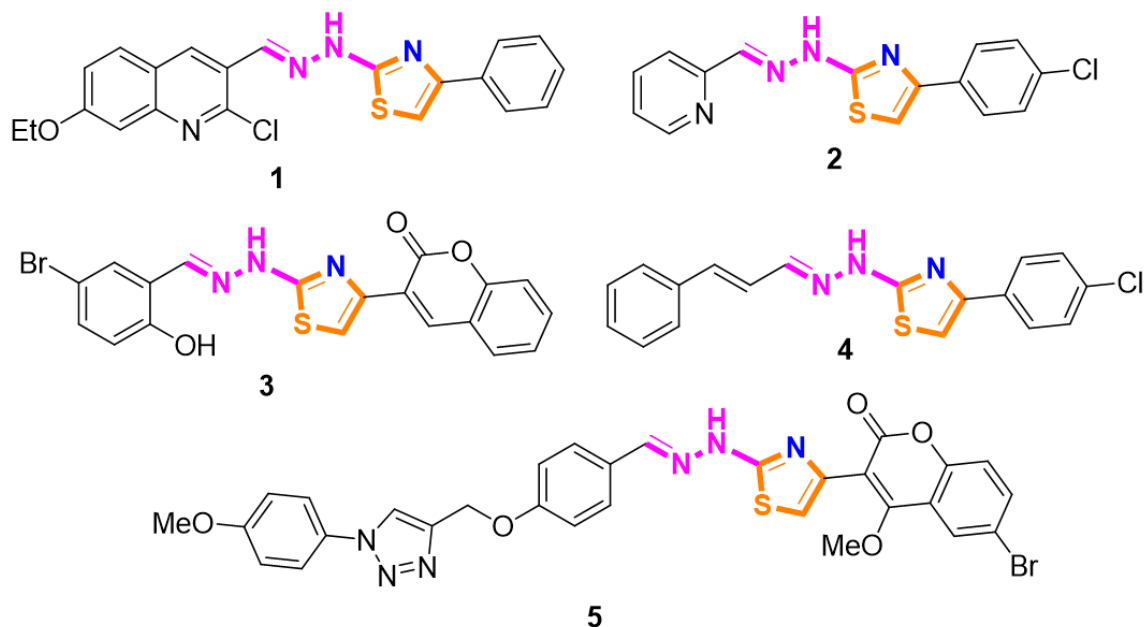


Figure 2. Thiazolyl hydrazone hybrid structures for antimicrobial effect

In addition to the unique antimicrobial effects exhibited by thiazole-hydrazone derivatives, pyrazole-hydrazone derivatives have also been reported to possess various antibacterial effects. For example, compound 6 was determined to be bactericidal for *S. aureus* and bacteriostatic for *A. baumannii* strains and was found to have low toxicity in *in vitro* and *in vivo* studies [16]. In a study in which aminoguanidine derivative 1,3-diphenyl pyrazole hydrazone derivatives were designed, compound 7 was found to be a potent antimicrobial agent against various bacterial strains with MIC values in the range of 1-8 $\mu\text{g/ml}$ [17]. A more exciting group of studies in the literature involves the design of thiazole-pyrazole-hydrazone derivatives and their investigation of antimicrobial effects. For example, among the pyrazole-thiazolinone hydrazone derivatives developed for the potential treatment of drug-resistant bacterial infections, compound (8) was found to be effective against the broad-spectrum antibiotic-resistant pathogen *N. Gonorrhoeae* [18]. In another study, developed thiazole-pyrazole-hydrazone derivatives [9] were found to be effective against *S. aureus* and *Klebsiella planticola* strains. In addition, coumarin-linked pyrazole derivative thiazole hydrazones (10) were reported as broad-spectrum antibacterial agents with moderate activity against the tested strains [19]. Trisubstituted pyrazoles containing coumarin-thiazole moiety (11) were reported as moderate growth inhibitors of bacterial strains (Figure 3). Compound 11 showed the most potent activity in the series, with MIC values as low as 15.5 $\mu\text{g/ml}$ [20].

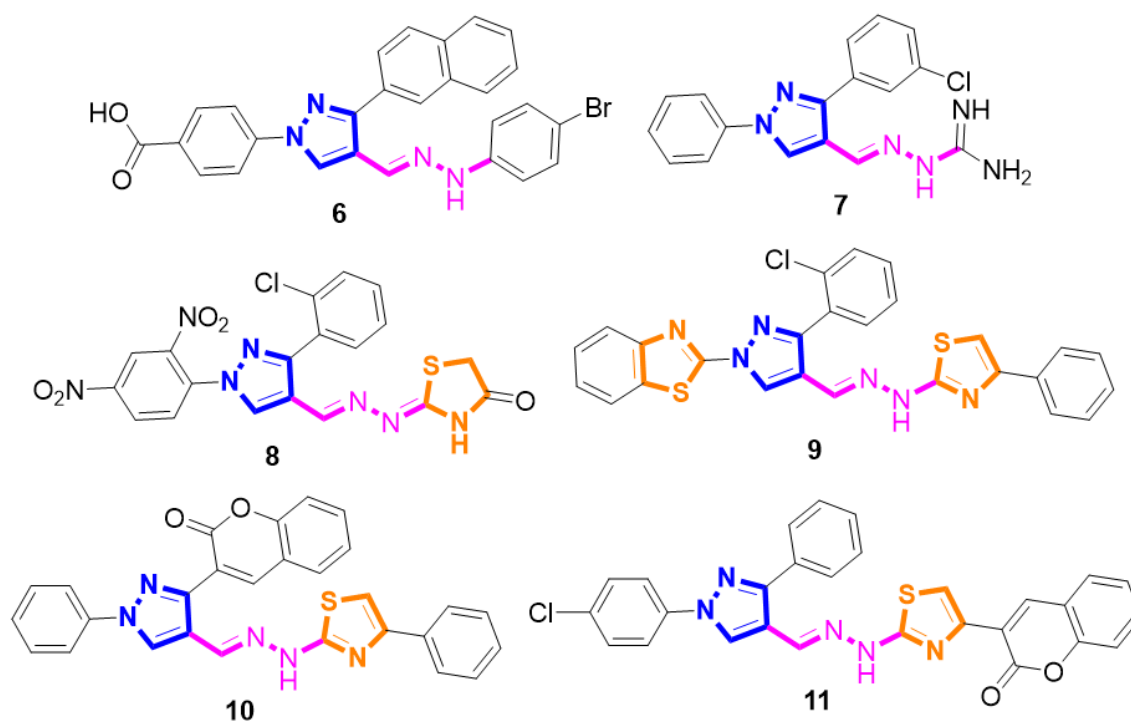


Figure 3. Thiazolyl/pyrazole-hydrazone hybrid structures for antimicrobial effect

In this study, the strong antimicrobial potential of derivatives formed by hybridization of thiazole, hydrazone, and pyrazole groups in the literature has led to the idea of molecular design in the development of new antimicrobial agents. Accordingly, a molecular design was created in which alkyl and phenyl derivatives were connected with the thiazole group, phenyl-substituted pyrazole group containing various electron-withdrawing and donating groups and finally, pyrazole and thiazole groups were connected with the hydrazone linker (Figure 4).

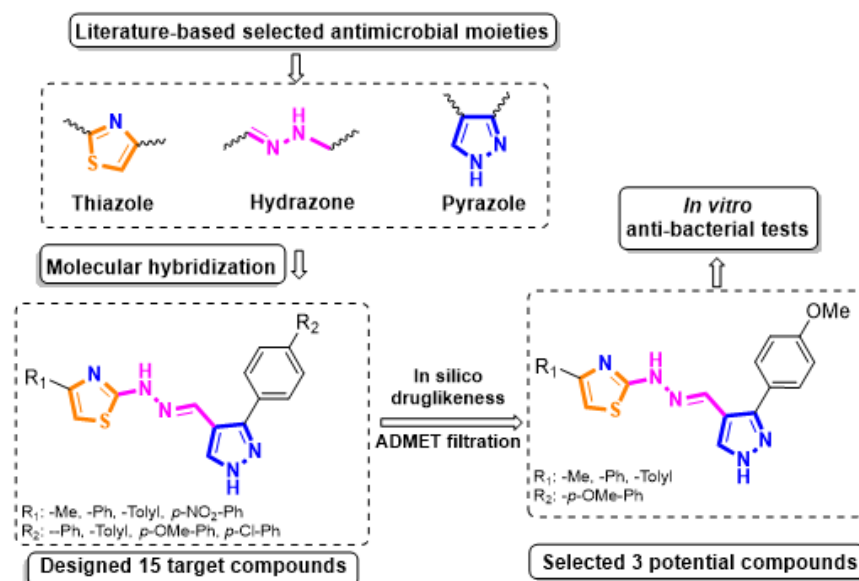


Figure 4. Rational design, structures of compounds designed from thiazole, hydrazone and pyrazole as antimicrobial moieties

As a result of various combinations with the mentioned strategy, 15 target compounds were designed (Figure 4). However, the main reasons for the failure of the designed drug candidate compounds in the clinical stages are that they do not have acceptable drug similarity, pharmacokinetic properties, and toxicity parameters. Therefore, the drug-similarity of the designed compounds and the absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) of the candidate drugs were evaluated *in silico*. After this filtering process, the 3 candidate compounds with the lowest toxicity profiles were determined and the synthesis, characterization, and *in vitro* antibacterial effect potentials of the selected 3 compounds were tested by the disk diffusion method. In addition, the potential inhibitory effect of the compounds on dihydrofolate reductase (DHFR), one of the antimicrobial effect pathways, was investigated by molecular docking method.

MATERIAL AND METHOD

In the design of the compounds, various methyl, phenyl and electron donor (e.g. -Me), electron-withdrawing (e.g. -NO₂) phenyl groups were used for R1 groups; electron donor (e.g. -Me, -OMe), halogen (-Cl) or electron-withdrawing (e.g. -NO₂) substituted phenyl groups were used for R2 groups for antimicrobial activity. Then, drug similarity and theoretical pharmacokinetic properties of the designed compounds were investigated.

In Silico Study

The toxicity prediction of the compounds was determined using ProTox-3.0 [21]. ProTox-3.0 utilizes molecular similarity, fragment propensities, frequent features, and a machine-learning approach (fragment similarity-based CLUSTER cross-validation) across 61 models to predict various toxicity endpoints. These endpoints include acute toxicity, organ toxicity, toxicological effects, molecular initiating events, metabolism, adverse outcome pathways (Tox21), and toxicity targets. Toxic doses are typically expressed as LD₅₀ mg/kg body weight values. The LD₅₀ represents the median lethal dose, meaning the dose at which 50% of test subjects die upon exposure to a compound. Toxicity classes are defined according to the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) with LD₅₀ values as follows:

- **Class I:** Fatal if swallowed (LD₅₀ ≤ 5 mg/kg)
- **Class II:** Fatal if swallowed (5 < LD₅₀ ≤ 50 mg/kg)
- **Class III:** Toxic if swallowed (50 < LD₅₀ ≤ 300 mg/kg)
- **Class IV:** Harmful if swallowed (300 < LD₅₀ ≤ 2000 mg/kg)
- **Class V:** May be harmful if swallowed (2000 < LD₅₀ ≤ 5000 mg/kg)
- **Class VI:** Non-toxic (LD₅₀ > 5000 mg/kg)

Synthesis of the Target Compounds

General Information

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Varian-Agilent Inova instrument (400 and 100 MHz, respectively) using Me₄Si (TMS) as the internal standard. Melting points were determined on a Stuart Melting Point (SMP30) analyzer using open glass capillaries. Column chromatography was performed on silica gel (60 mesh, Silicycle). Commercially available materials were used without further purification. The analyses of the C, H, and N elements of the compounds were made with the LECO 932 CHNS (St. Joseph, MI, USA) elemental analysis device. Analysis results have a maximum deviation of ±0.4 from the calculated theoretical values.

Synthesis of Semicarbazone Derivative

Initially, 5 mmol p-methoxys-acetophenone (12) was dissolved/suspended in ethanol (10 ml) and magnetically stirred with 6 mmol semicarbazide (13) and 7.5 mmol NaOAc. The reaction mixture was refluxed at 70°C for 4 hrs., and the completion of the reaction was checked by TLC. Afterward, the experiment was terminated and cooled to room temperature, and the formed particles were filtered out. Solid particles washed several times with distilled water were allowed to dry at room temperature. The obtained semicarbazone derivative (14) were used for the next step without further purification [22].

Synthesis of Pyrazole-Carboxaldehyde Derivative

A chilled solution of 3 mmol *N,N*-dimethyl formamide (DMF), and 3 mmol POCl₃ was added dropwise on each other and stirred for 15 min at 0°C. A solution of 1 mmol semicarbazone derivative (14) in DMF (3ml) was added dropwise to the reaction mixture and heated at 80°C for 3h. The reaction mixture was cooled to room temperature, transferred to 20 ml of an ice-water mixture, and stirred for 30 min. Then, 10% aqueous sodium hydroxide (NaOH) solution was added dropwise to the reaction mixture until pH 8. The resulting precipitate was filtered, washed with water (15ml), and dried in the open air. The crude product (15) was purified by column chromatography on silica gel eluting with *n*-hexane/EtOAc (5/1) [23].

Synthesis of Thiosemicarbazone Derivative

5 mmol pyrazole-carboxaldehyde derivative (15) was dissolved in ethanol (10 ml) and magnetically stirred with 6 mmol thiosemicarbazide. The reaction mixture was refluxed at 70°C for 8-16 h., and the completion of the reaction was checked by TLC. Afterward, the experiment was terminated and cooled to room temperature, and the formed particles were filtered out. Solid particles washed several times with distilled water were allowed to dry at room temperature. The furnished thiosemicarbazone derivative (16) was used for the next step without further purification [24].

Synthesis of Target Compounds

4 mmol thiosemicarbazone derivative (16) was dissolved in 10 ml of ethanol by heating. 5 mmol of chloroacetone or alpha bromo acetophenone derivatives were added to the reaction medium and reflux was performed for 1 hour. As the reaction progressed, solid particles began to form, and the reaction was terminated. The reaction mixture, which was cooled to room temperature, was transferred to 50 ml of ice-water mixture and magnetically stirred for 30 min. The solid particles formed were separated by filtration, washed in 15 ml of an ethanol-water mixture (1:1), and dried in an oven at 40°C [25]. Title compounds (17a-c) were purified by chromatography on silica gel eluting with hexane/EtOAc (1:1). The structure of newly synthesized compounds was elucidated based on elemental analysis and NMR spectral data. The physical properties and spectral data of the compounds are presented below.

(E)-2-(2-((3-(4-methoxyphenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)methylene)hydrazineyl)-4-methyl thiazole (17a)

Gray powder, M.p. 206-208°C, Yield: 85%, Rf: 0.72 (ethyl acetate/*n*-hexane (1/1)). ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 8.36 (s, 1H, -CH=N), 8.03 (bs, 1H, Ar-H), 7.57-7.55 (m, AA'BB' system, 2H, Ar-H), 7.07-7.04 (m, AA'BB' system, 2H, Ar-H), 6.55 (d, *J*=0.9 Hz, 1H, Ar-H), 3.80 (s, 3H, -OCH₃), 2.20 (quasi q, *J*= 0.9 Hz, 3H, -CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 167.8, 160.3, 141.9, 141.3, 130.5, 130.2, 123.1, 115.0, 113.4, 130.6, 56.0, 15.5. FT-IR (ATR cm⁻¹): 3116, 2917, 2837, 1615, 1559, 1423, 1286, 1088, 945, 814, 716, 659. Anal. calcd. for C₁₅H₁₅N₃OS: C: 57.49; H: 4.82; N: 22.35; Found: C: 57.46; H: 4.85; N: 22.36.

(E)-2-(2-((3-(4-methoxyphenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)methylene)hydrazineyl)-4-phenyl thiazole (17b) [25]

Light orange powder, M.p. 234-235°C, Yield: 91%. Rf: 0.63 (ethyl acetate/*n*-hexane (1/1)). ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 13.26 (bs, 1H, -NH), 11.77 (bs, 1H, -NH), 8.09 (s, 1H, -CH=N), 7.85-7.83 (m, AA'BB' system, 2H, Ar-H), 7.64-7.53 (m, 2H, Ar-H), 7.46-7.33 (m, 3H, Ar-H), 7.31-7.27 (m, 2H, Ar-H), 7.15-7.04 (m, 2H, Ar-H), 3.83 (s, 3H, -OCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 168.6, 160.0, 150.9, 135.3, 130.0, 129.0, 127.9, 126.0, 114.8, 114.7, 113.9, 103.6, 55.8. FT-IR (ATR cm⁻¹): 3085, 2923, 2824, 1702, 1565, 1509, 1435, 1339, 1237, 1168, 1106, 1044, 914, 827, 752, 690. Anal. calcd. for C₂₀H₁₇N₃OS: C: 63.98; H: 4.56; N: 18.65; Found: C: 64.01; H: 4.55; N: 18.68.

(E)-2-(2-((3-(4-methoxyphenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)methylene)hydrazineyl)-4-(*p*-tolyl) thiazole (17c)

Light brown powder, M.p. 229-230°C, Yield: 93%. Rf: 0.66 (ethyl acetate/*n*-hexane (1/1)). ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 8.16 (s, -CH=N), 7.97 (s, 1H, Ar-H), 7.72-7.66 (m, AA'BB' system, 2H, Ar-H), 7.60-7.55 (m, AA'BB' system, 2H, Ar-H), 7.23-7.17 (m, 3H, Ar-H), 7.09-7.04 (m, AA'BB'

system, 2H, Ar-H), 3.81 (s, 3H, -OCH₃), 2.30 (s 3H, -CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 168.8, 160.2, 149.1, 145.0, 138.1, 137.9, 135.4, 131.5, 130.2, 129.9, 126.3, 123.3, 114.9, 113.9, 103.2, 56.0, 21.5. FT-IR (ATR cm⁻¹): 3153, 2936, 2849, 1664, 1584, 1503, 1423, 1249, 1168, 1100, 1020, 938, 814, 728, 685. Anal. calcd. for C₂₀H₁₇N₅OS: C: 64.46; H: 4.92; N: 17.98; Found: C: 64.50; H: 4.89; N: 17.99.

Antimicrobial Tests

The inhibition zone diameter, an indicator of the reaction that prevents the growth of bacteria by the synthesized compounds (17a-c), was measured by the disk diffusion method [26]. Bacterial concentrations adjusted according to 10⁸ CFU/ml 0.5 McFarland were used in this study. *Escherichia coli* (gram-negative) and *Staphylococcus aureus* (gram-positive) bacterial strains were used in the research. 3 antibiotics [Gentamicin (10 µg), Amoxicillin (25 µg), Tetracycline (30 µg)] and 6 mm blank disks (BIOANALYSE Blank Disc in Cartridge ASD10011) were used for test strains. The compound concentrations were adjusted to 80 µg/ml and 40 µg/ml. After the bacteria were cultured in the media by the spreading technique, the extract-impregnated disks were placed in petri dishes. It was incubated for 16-24 hours at 37°C. At the end of incubation, the zones formed around the discs were measured in mm.

Molecular Docking Studies

Molecular docking studies were conducted using AutoDock 4.2 software to determine the interactions of selected and control compounds with the crystal structure of DHFR enzyme (PDB ID: 1DLS) obtained from RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org). Ligand compounds were drawn in 3D using Gaussview 5.0 and optimized using DFT method with the help of Gaussian 03 package based on theoretical level of B3LYP method and 6-31G basis set. The position and location of natural ligand methotrexate were taken as reference for target binding sites in crystal structure. In docking studies, x: 31.815; y: 19.694; z: -1.861 coordinate centers were determined. After re-docking, cluster RMSD value (Root Mean Square Deviation: 0-2 Å range) was determined to be within acceptable range for both targets in 10 different conformations of methotrexate. Then, a grid box with 50×50×50 points centered on the predicted positions and a grid point spacing of 0.375 Å was created for docking studies. The docking operations started with the removal of unwanted solvents, water, and ligands from the protein structures. Then, polar hydrogen atoms, Gasteiger partial charges, and Kollman charges were added to the targets. Rotatable bonds of the compounds were also checked. Target sites of the selected compounds similar to known compounds were docked under validated conditions using Autodock 4.2 software. Lamarckian genetic algorithm (10 runs) approach was applied and the population size was set to 300 for each simulation. The conformation with the highest receptor affinity was selected to determine the binding energy and the ligand-receptor complex of the corresponding conformation was formed.

RESULT AND DISCUSSION

Identification of Candidate Compounds

Potential toxicity of 15 compounds was assessed based on their LD₅₀ values. Three of the 15 compounds (17a, 17b, and 17c) had higher LD₅₀ values (Table 1) compared to the other 12 compounds (Table S1). In other words, these three compounds must be used in higher doses to cause toxicity in healthy animals compared to the other 12 compounds. Therefore, these three compounds were identified as candidates for further studies.

Table 1. Predictive acute toxicities of candidate compounds

Compounds	SMILES	LD ₅₀ (mg/kg) (ProTox-3.0)
17a	<chem>COC1=CC=C(C=C1)C1=NNC=C1\C=C=N\NC1=NC(C)=CS1</chem>	1000
17b	<chem>COC1=CC=C(C=C1)C1=NNC=C1\C=C=N\NC1=NC(=CS1)C1=CC=CC=C1</chem>	1000
17c	<chem>COC1=CC=C(C=C1)C1=NNC=C1\C=C=N\NC1=NC(=CS1)C1=CC=C(C)C=C1</chem>	1000

All three compounds have an LD₅₀ of 1000 mg/kg, which means they fall under 'Harmful if swallowed (300 < LD₅₀ ≤ 2000 mg/kg)'. The other 13 compounds fall under Class III

Synthesis of the Target Compounds

The synthetic approach adopted to obtain the target compounds is shown in Figure 4. This method consists of four steps; initially, the conversion of *p*-methoxy-substituted acetophenone (12) with semicarbazide (13) to semicarbazone derivative (14) and their next step reactions with Vilsmeier-Haack reagents (POCl₃, DMF) to pyrazole-carboxaldehyde derivative (15) were prepared. Then, by reaction of the carbaldehyde group with thiosemicarbazide (16) and then with chloroacetone or phenacyl derivatives, the targeted thiazolyl/pyrazole-hydrazone hybrid derivatives (17a-c) were furnished in high yields (Figure 5).

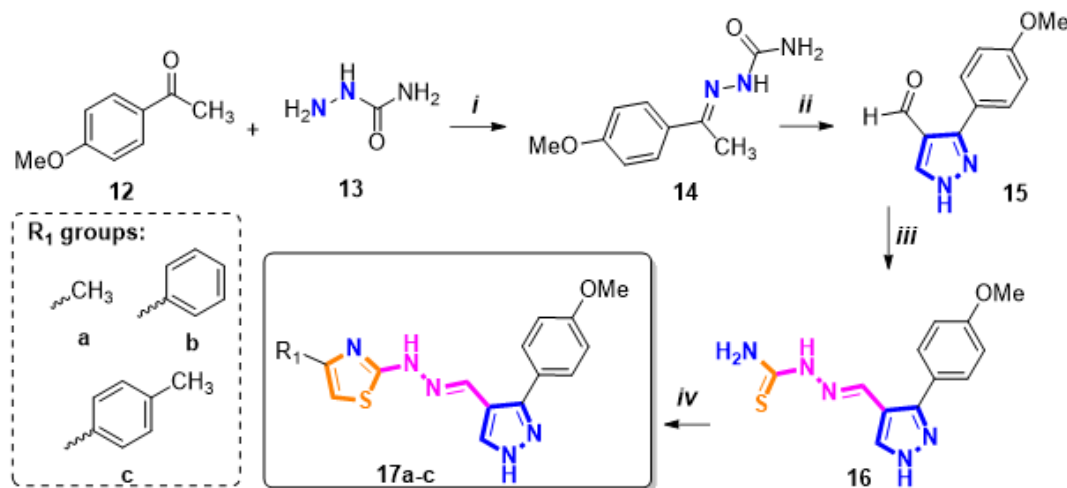


Figure 5. Total synthesis scheme of target compounds, *i*: NaOAc, EtOH, Reflux, 4 h. *ii*: DMF, POCl₃, 80°C, 3 h. *iii*: thiosemicarbazide, EtOH, Reflux, 2h. *iv*: Chloroacetone or phenacyl/*p*-methyl-phenacyl bromide, Reflux, 2h

The characterization of the synthesized compounds was completed by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, elemental analysis, and FT-IR. Particularly, in the ¹H-NMR spectrum, only the -NH group attached to pyrazole and hydrazone -NH groups of molecule 17b showed resonance as broad singlets at 13.26 ppm and 11.77 ppm, respectively. The proton attached to the hydrazone carbon in compounds 17a, 17b, and 17c appeared as singlets at 8.36 ppm, 8.09 ppm and 8.16 ppm, respectively. The -CH protons of the pyrazole ring were observed between 8.03-7.97 and the -CH protons of the thiazole ring were observed among other aromatics except 17a. The -CH₃ group attached to thiazole in compound 17a was found to interact with thiazole -CH (*J*=0.9 Hz). The aromatic protons of the *p*-methoxy phenyl group in all structures resonated as the AA'BB' system and all aliphatic proton peaks were consistent with the structures. The carbon number and resonance region in the ¹³C-NMR spectrum of the compounds matched the structures characteristically.

Antimicrobial Tests

In this study, it was observed that among the tested compounds, 17b did not show any antibacterial activity against both *E. coli* and *S. aureus* bacterial strains. Compound 17a at 80 µg/ml concentration induced a 7 mm and 8 mm zone diameter against *E. coli* and *S. aureus* strains respectively while at 40 mg/ml concentration, it induced a 7 mm zone diameter only against *S. aureus* strain. Compound 17c at 80 µg/ml concentration induced a 8 mm zone diameter against *E. coli* strain and a 9 mm zone diameter against *S. aureus* strain. At 40 µg/ml concentration of compound 17c, 7 mm and zone diameters were observed for *E. coli* and *S. aureus* strains, respectively. In the antibiotic disks used in the study, Gentamicin 17 mm, Amoxicillin 20 mm, and Tetracycline 22 mm zone diameters were determined for *E. coli* strain, while Gentamicin 21 mm, Amoxicillin 15 mm and Tetracycline 24 mm zone diameters

were determined for *S. aureus* strain. It was determined that the highest antibacterial effect was at 80 µg/ml of compound 17c in *S. aureus* strain (Table 2).

The results of the study show that the antibacterial activity of the compounds depends on their concentration. In particular, compound 17c is seen to have a stronger antibacterial effect at higher concentrations. In addition, it was found that the antibacterial activity of the compounds was lower compared to antibiotics, but they could show significant effects at certain concentrations. This result indicates that the compounds can be used as potential antibacterial agents, but their activities need to be optimized. In further studies, the effectiveness of the compounds against different bacterial strains and their mechanisms of action need to be investigated in more detail.

Table 2. Antibacterial activity results of compounds tested against *E. coli* and *S. aureus* strains

Entry	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	80 µg/ml	40 µg/ml	80 µg/ml	40 µg/ml
17a	7 mm	-	8 mm	7 mm
17b	-	-	-	-
17c	8 mm	7 mm	9 mm	8 mm
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Gentamicin (CN)	17		21	
Amoxicillin (AX)	20		15	
Tetracycline (TE)	22		24	

-: None, Gentamicin: 10 µg, Amoxicillin: 25 µg, Tetracycline:30 µg

Molecular Docking Studies

Target-oriented designs in the development of new antimicrobial agents allow the development of more rational drug candidates. Our literature review found that the inhibitory potential of thiazolyl hydrazone derivatives against DHFR enzyme, one of the antimicrobial targets, was as effective as methotrexate control. Based on this, the DHFR inhibition potential of the compounds developed in this study was compared with methotrexate control by molecular docking method and the results are presented in Table 3.

Table 3. Docking scores of compounds (17a-c) and methotrexate against DHFR enzyme

Compounds	DHFR (PDB ID: 1DLS)	
	Binding affinity (kcal/mol)	Interacted amino acid residues
Methotrexate	-11.02	Ile7, Val8, Ala9, Glu30, Phe31, Ser59, Ile60, Asn64, Arg70, Val115
17a	-7.06	Ala9, Phe31, Ser59, Ile60, Asn64, Leu67, Val115
17b	-8.68	Ala9, Trp24, Leu27, Phe31, Phe34, Ile60, Leu67, Val115
17c	-9.47	Tyr22, Phe31, Pro61, Leu67, Pro66, Lys68, Arg70

According to the molecular docking results, the compounds were able to form complexes with the DHFR enzyme by establishing Methotrexate-like interactions. In addition, although the binding affinity of the compounds is lower than Methotrexate, it can be said that they have a very high binding affinity with DHFR binding energies between -7.06 and -9.47 kcal/mol. In addition, it is seen in the sup info file that the compounds are positioned in the DHFR active site similar to Methotrexate. All these data can be interpreted as compounds with antimicrobial potential may act through inhibition of the DHFR enzyme.

As a result, a series of hybrid compound derivatives were designed in which thiazole and pyrazole systems were connected with hydrazone. Among the designed compounds, compounds 17a-c were determined to have more suitable drugability parameters and were synthesized. The antibacterial effect potential of the synthesized compounds on *E. coli* and *S. aureus* strains was tested and especially

compound 17c was found to be a potential antibacterial agent. In addition, molecular docking studies showed that the synthesized compounds (especially compound 17c) have the potential to inhibit the DHFR enzyme, which is an important antibacterial pathway, and therefore the antibacterial effect may be due to the inhibition of this enzyme. In addition, this study will contribute to the development of effective new antibacterial agents by optimizing the structural properties of the compounds and investigating their activities and mechanisms of action against different bacterial strains in more detail.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors also acknowledge for laboratory facilities of this work by Faculty of Pharmacy, Van Yuzuncu Yil University.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

CONFLICT OF INTEREST

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

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

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

REFERENCES

1. Muteeb, G., Rehman, M.T., Shahwan, M., Aatif, M. (2023). Origin of antibiotics and antibiotic resistance, and their impacts on drug development: A narrative review. *Pharmaceuticals*, 16(11), 1615. [\[CrossRef\]](#)
2. Bassani, D., Moro, S. (2023). Past, present, and future perspectives on computer-aided drug design methodologies. *Molecules*, 28(9), 3906. [\[CrossRef\]](#)
3. Lounnas, V., Ritschel, T., Kelder, J., McGuire, R., Bywater, R.P., Foloppe, N. (2013). Current progress in structure-based rational drug design marks a new mindset in drug discovery. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 5(6), e201302011. [\[CrossRef\]](#)
4. Bhunia, S.S., Saxena, M., Saxena, A.K. (2021). Ligand-and structure-based virtual screening in drug discovery. In: *Biophysical and Computational Tools in Drug Discovery* (pp. 281-339). Cham: Springer International Publishing. [\[CrossRef\]](#)
5. de Sena Murteira Pinheiro, P., Franco, L.S., Montagnoli, T.L., Fraga, C.A.M. (2024). Molecular hybridization: A powerful tool for multitarget drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 19(4), 451-470.
6. Oselusi, S.O., Dube, P., Odugbemi, A.I., Akinyede, K.A., Ilori, T.L., Egieyeh, E., Egieyeh, S.A. (2024). The role and potential of computer-aided drug discovery strategies in the discovery of novel antimicrobials. *Computers in Biology and Medicine*, 107927. [\[CrossRef\]](#)
7. Shallcross, L.J., Howard, S.J., Fowler, T., Davies, S.C. (2015). Tackling the threat of antimicrobial resistance: From policy to sustainable action. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1670), 20140082. [\[CrossRef\]](#)
8. Petrou, A., Fesatidou, M., Geronikaki, A. (2021). Thiazole ring-A biologically active scaffold. *Molecules*, 26(11), 3166. [\[CrossRef\]](#)
9. Gümüş, M., Yakan, M., Koca, İ. (2019). Recent advances of thiazole hybrids in biological applications. *Future Medicinal Chemistry*, 11(15), 1979-1998. [\[CrossRef\]](#)
10. Althagafi, I., El-Metwaly, N., Farghaly, T.A. (2019). New series of thiazole derivatives: Synthesis, structural elucidation, antimicrobial activity, molecular modeling and MOE docking. *Molecules*, 24(9), 1741. [\[CrossRef\]](#)
11. Ammar, Y.A., Abd El-Hafez, S.M., Hessein, S.A., Ali, A.M., Askar, A.A., Ragab, A. (2021). One-pot strategy for thiazole tethered 7-ethoxy quinoline hybrids: Synthesis and potential antimicrobial agents as

- dihydrofolate reductase (DHFR) inhibitors with molecular docking study. *Journal of Molecular Structure*, 1242, 130748. [\[CrossRef\]](#)
12. de Oliveira Cardoso, M.V., de Siqueira, L.R.P., da Silva, E.B., Costa, L.B., Hernandez, M.Z., Rabello, M.M., Leite, A.C.L. (2014). 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 86, 48-59. [\[CrossRef\]](#)
 13. Arshad, A., Osman, H., Bagley, M.C., Lam, C.K., Mohamad, S., Zahariluddin, A.S.M. (2011). Synthesis and antimicrobial properties of some new thiazolyl coumarin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(9), 3788-3794. [\[CrossRef\]](#)
 14. Lino, C.I., de Souza, I.G., Borelli, B.M., Matos, T.T.S., Teixeira, I.N.S., Ramos, J.P., de Oliveira, R.B. (2018). Synthesis, molecular modeling studies and evaluation of antifungal activity of a novel series of thiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 151, 248-260. [\[CrossRef\]](#)
 15. Gondru, R., Kanugala, S., Raj, S., Kumar, C.G., Pasupuleti, M., Banothu, J., Bavantula, R. (2021). 1,2,3-triazole-thiazole hybrids: Synthesis, *in vitro* antimicrobial activity and antibiofilm studies. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 33, 127746. [\[CrossRef\]](#)
 16. Alnufaie, R., Alsup, N., Kc, H R., Newman, M., Whitt, J., Chambers, S.A., Alam, M.A. (2020). Design and synthesis of 4-[4-formyl-3-(2-naphthyl)pyrazol-1-yl] benzoic acid derivatives as potent growth inhibitors of drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antibiotics*, 73(12), 818-827. [\[CrossRef\]](#)
 17. Li, Y.R., Li, C., Liu, J.C., Guo, M., Zhang, T.Y., Sun, L.P., Piao, H.R. (2015). Synthesis and biological evaluation of 1, 3-diaryl pyrazole derivatives as potential antibacterial and anti-inflammatory agents. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 25(22), 5052-5057. [\[CrossRef\]](#)
 18. Ebenezer, O., Singh-Pillay, A., Koorbanally, N.A., Singh, P. (2021). Antibacterial evaluation and molecular docking studies of pyrazole-thiosemicarbazones and their pyrazole-thiazolidinone conjugates. *Molecular Diversity*, 25, 191-204. [\[CrossRef\]](#)
 19. Gondru, R., Banothu, J., Thatipamula, R.K., Althaf Hussain, SK., Bavantula, R. (2015). 3-(1-Phenyl-4-((2-(4-arylthiazol-2-yl)hydrazono)methyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)-2*H*-chromen-2-ones: One-pot three component condensation, *in vitro* antimicrobial, antioxidant and molecular docking studies. *RSC Advances*, 5(42), 33562-33569. [\[CrossRef\]](#)
 20. Harikrishna, N., Isloor, A.M., Ananda, K., Obaid, A., Fun, H.K. (2015). 1, 3, 4-Trisubstituted pyrazole bearing a 4-(chromen-2-one) thiazole: Synthesis, characterization and its biological studies. *RSC Advances*, 5(54), 43648-43659. [\[CrossRef\]](#)
 21. Banerjee, P., Kemmler, E., Dunkel, M., Preissner, R. (2024). ProTox 3.0: A webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Research*, 52(1), 513-520. [\[CrossRef\]](#)
 22. Lebedev, A.V., Lebedeva, A.B., Sheludyakov, V.D., Kovaleva, E.A., Ustinova, O. L., Kozhevnikov, I. B. (2005). Synthesis of 3-substituted arylpyrazole-4-carboxylic acids. *Russian Journal of General Chemistry*, 75, 782-789. [\[CrossRef\]](#)
 23. Kuzu, B., Ergüç, A., Karakuş, F., Arzuk, E. (2023). Design, synthesis, and antiproliferative activities of novel thiazolyl-pyrazole hybrid derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 32(8), 1690-1700. [\[CrossRef\]](#)
 24. Kuzu, E., Kuzu, B. (2023). Tandem synthesis of novel thiazole-substitutedpyrrolo[1,2-*d*][1,2,4] triazin-4(3*H*)-one derivatives and their theoretical pharmacokinetic profiles. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 59(1), 80-87. [\[CrossRef\]](#)
 25. Malladi, S., Isloor, A. M., Peethambar, S.K., Shivananda, K.N. (2012). Synthesis and evaluation of antioxidant, antimicrobial activities of new 2,4-disubstituted thiazoles. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 4(3), 81-88.
 26. Jorgensen, J.H., Turnidge, J.D. (2015). Susceptibility test methods: Dilution and disk diffusion methods. *Manual of Clinical Microbiology*, 1253-1273. [\[CrossRef\]](#)



VILDAGLIPTIN IMPROVES DETRUSOR CONTRACTILITY IN A MOUSE MODEL OF CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED OVERACTIVE BLADDER

VİLDAGLIPTİN, SİKLOFOSFAMİD İLE İNDÜKLENEN AŞIRI AKTİF MESANE FARE MODELİNDE DETRÜSÖR KONTRAKTİLİTESİNİ İYİLEŞTİRİR

Seçkin ENGİN^{1*} , Elif Nur BARUT¹ , Merve İSMAİLOĞLU KARACA² ,
Melis Nazlı YANIK² 

¹Karadeniz Technical University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, 61080, Trabzon, Türkiye

²Karadeniz Technical University, Graduate School of Health Sciences, Department of Pharmacology, 61080, Trabzon, Türkiye

ABSTRACT

Objective: Overactive bladder (OAB) is a common urological disorder associated with detrusor overactivity linked to local tissue inflammation resulting in bladder hypersensitivity. The present study was aimed to investigate the therapeutic potential of vildagliptin (VIL), an anti-diabetic drug with anti-inflammatory effects, in a mouse model of cyclophosphamide (CP)-induced OAB.

Material and Method: To induce an animal model of OAB, female Balb/c mice were intraperitoneally (i.p) injected with CP (80 mg/kg) every two days for 7 days. Then, mice were orally treated with saline (OAB model), VIL (10 or 50 mg/kg/day) or solifenacin (10 mg/kg/day) for 7 consecutive days. On the 17th day of experiment, organ-bath experiments were performed using isolated mouse detrusor muscle to evaluate tissue contractility. In another set of mice, bladder inflammation was assessed by Evans blue extravasation.

Result and Discussion: Carbachol-induced contraction of detrusor strips significantly increased in OAB mice, which was reversed by treatment with VIL at 50 mg/kg or solifenacin. In addition, VIL treatment (50 mg/kg) reduced relative bladder weight and Evans blue dye extravasation into the bladders in CP-injected mice, demonstrating the inhibitory effect of VIL on CP-induced bladder inflammation. Our results showed that VIL ameliorated detrusor overactivity in a mouse model of CP-induced OAB by partially suppressing bladder inflammation.

Keywords: Bladder inflammation, detrusor, evans blue, overactive bladder, solifenacin, vildagliptin

ÖZ

Amaç: Aşırı aktif mesane (AAM), mesane aşırı duyarlılığına neden olan lokal doku inflamasyonuna bağlı detrüösör aşırı aktivitesi ile ilişkili yaygın bir ürolojik bozukluktur. Bu çalışma, siklofosfamid (SFD) ile indüklenen AAM fare modelinde, anti-inflamatuar etkili anti-diyabetik bir ilaç olan vildagliptinin (VIL) terapötik potansiyelini araştırmayı amaçlamıştır.

Gereç ve Yöntem: AAM modelini indüklemek için dişi Balb/c farelere intraperitoneal olarak (i.p) 7 gün boyunca her iki günde bir SFD (80 mg/kg) enjekte edildi. Daha sonra fareler, art arda 7 gün boyunca oral olarak serum fizyolojik (AAM modeli), VIL (10 veya 50 mg/kg/gün) veya solifenasin (10 mg/kg/gün) ile tedavi edildi. Deneyin 17. gününde, mesane kontraktilesini değerlendirmek için

* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Seçkin Engin
e-mail / e-posta: seckinengin@ktu.edu.tr, Phone / Tel.: +904623778850

izole fare detrusör kası kullanılarak organ banyosu deneyleri yapıldı. Başka bir fare grubunda mesane inflamasyonu, Evans mavisi ekstravazasyonu ile değerlendirildi.

Sonuç ve Tartışma: Karbakol ile indüklenen detrusör kasılması, AAM modeli farelerinde önemli ölçüde arttı ve bu artış, VIL (50 mg/kg) veya solifenasin tedavisi ile düzeldi. Ayrıca; VIL tedavisi (50 mg/kg), SFD enjekte edilmiş farelerde rölatif mesane ağırlığını ve Evans mavi boyasının mesanelere ekstravazasyonunu azalttı. Bu sonuç, VIL'in SFD kaynaklı mesane inflamasyonu üzerindeki inhibitör etkisini ortaya koydu. Sonuçlarımız, VIL'in mesane inflamasyonunu kısmen baskılayarak SFD kaynaklı bir AAM fare modelinde detrusör aşırı aktivitesini iyileştirdiğini ortaya koydu.

Anahtar Kelimeler: Aşırı aktif mesane, detrusor, evans mavisi, mesane inflamasyonu, solifenasin, vildagliptin

INTRODUCTION

Overactive bladder (OAB) is a prevalent debilitating condition accompanied by frequency and nocturia, with or without urgency urinary incontinence and these lower urinary tract symptoms are often associated with detrusor overactivity defined as involuntary contractions of the detrusor smooth muscle [1]. Current pharmacotherapies of OAB include anti-muscarinic drugs and β 3 adrenergic receptor agonists with limited efficacy and serious side effects leading to the poor compliance, which has led to high demand for novel drugs with improved efficacy and safety [2]. OAB is considered to have multifactorial etiology and its pathophysiology has not yet been completely elucidated. Recently, an inflammatory process has been reported to be involved in OAB and anti-inflammatory agents have been suggested to possess therapeutic potential for OAB [1,3].

Cyclophosphamide (CP) is one of most commonly used agent to induce an experimental animal model of OAB. It has been reported that multiple injection of CP caused OAB syndrome symptoms in mice [4-6]. The urotoxic metabolite acrolein is formed by hepatic microsomal enzymatic hydroxylation of CP and accumulates in the bladder, leading to urothelial damage and impaired urothelial barrier function by inducing bladder inflammation [7].

Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors such as vildagliptin (VIL), sitagliptin, saxagliptin, linagliptin and alogliptin are orally effective drugs that improve glycemia in type 2 diabetes by preventing the degradation and thus increasing the level of incretins. Accumulating evidence suggests that they also exert pleiotropic effects beyond the glucose-lowering action [8]. Among DPP-4 inhibitors, VIL has recently gained attention due to its anti-inflammatory effects, which highlights the potential clinical repurposing of VIL for inflammation-related diseases [9-12]. The precise mechanisms of the anti-inflammatory effects of VIL remain elusive, however, toll-like receptors (TLRs) and nuclear factor kappa-B (NF κ B) signaling pathways have been reported to be involved in the anti-inflammatory action of VIL [10-12].

In the present study, it was aimed to investigate the therapeutic effect of VIL in a mouse model of CP-induced OAB.

MATERIAL AND METHOD

Animals

Balb/c female mice weighing 25-35 g, aged 8-10 weeks, were used in this study. The mice were housed in cages at a constant temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ under a 12 h light/12 h dark cycle, with free access to food and water. The experimental procedures were approved by Institutional Animal Care and Use Ethics Committee (approval number: 2023/45).

Chemicals and Drugs

VIL and solifenacin succinate were obtained from Ali Raif Pharmaceuticals and İlko Pharmaceuticals, Türkiye, respectively. Carbachol (CCh) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and CP (Endoxan[®]) was obtained from Baxter Oncology GmbH (Frankfurt, Germany). VIL, solifenacin and CP were freshly dissolved in 0.9% sterile saline prior to administration.

Induction of Experimental OAB Model and Treatments

Female Balb/c mice were randomly divided into six groups (n=11-14/group): *control*- saline-injected plus treatment with saline, *OAB group*- CP-injected plus treatment with saline, *OAB+VIL10*- CP-injected plus treatment with VIL at 10 mg/kg, *OAB+VIL50*- CP-injected plus treatment with VIL at 50 mg/kg, *OAB+SOL*- CP-injected plus treatment with anti-muscarinic drug, solifenacin at 10 mg/kg and *VIL50*- saline-injected plus treatment with VIL at 50 mg/kg. OAB was induced by totally four i.p injections of CP, as described previously [6]. CP (80 mg/kg, i.p) was administered every other day for 7 consecutive days. Control and VIL50 groups received only saline injections. 2 days after the fourth CP and saline injection, mice were treated with VIL (10 and 50 mg/kg/day), solifenacin succinate (10 mg/kg/day) or saline for 7 consecutive days. On the 17th day of the experimental protocol, the mice were euthanized by cervical dislocation and the whole urinary bladders were harvested for contractility studies or Evans blue extravasation assay (Figure 1). Mice were given saline, VIL and solifenacin orally via a gavage needle. The experimental protocol and doses of the drugs were chosen based on previous studies [5,9,13]. Relative bladder weights of all groups were determined by calculating the ratio of wet bladder weight (mg) to body weight (g) of mice to evaluate bladder hypertrophy as a marker of inflammatory edema [14,15].

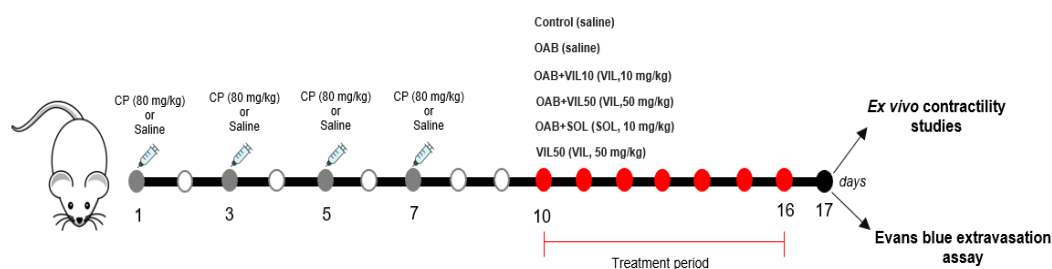


Figure 1. Schematic representation of the experimental design. Mice were treated once a day through the treatment period. VIL and solifenacin were given orally. CP, cyclophosphamide; OAB, overactive bladder; SOL, solifenacin; VIL, vildagliptin.

Contractility Studies

In a set of mice in each group (n=6-8/group), one detrusor smooth muscle strip was prepared from each urinary bladder, as described previously [16]. Detrusor strips were suspended longitudinally between an isometric force transducer (MAY FDT-10A Force Displacement Transducer, Commat, Ankara, Türkiye) and a steel curved hook within a 30 ml water-jacketed tissue baths containing Krebs-Henseleit solution (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgSO₄ 1.3, 2.5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, and 11 mM glucose) continuously bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂ at 37°C. Changes in isometric force were recorded using a MP35 data acquisition system (Biopac Systems, Goleta, CA, USA). Each strip was stretched to 1 g of tension and allowed to equilibrate for 1 hour while changing bath solution every 20 min. Then, strips were firstly challenged with KCl (80 mM) to test tissue viability. After an equilibration period, CCh (10⁻⁸-10⁻⁴ M) was added to bathing solution to obtain cumulative concentration-response curves. CCh-induced contractile responses of strips were normalized to the weight of each strip and expressed as milligram tension per milligram strip weight [16,17].

Evans Blue Extravasation Assay

In another set of mice (n=5-6/group), Evans blue extravasation into the bladders were measured to assess bladder inflammation. Briefly, Evans blue dye (0.5% w/v in saline, 200µl) was injected intravenously via tail vein 30 min before euthanasia. The bladders were dissected from the body, weighed, sliced longitudinally, and incubated in 1 ml formamide at 56°C for 24 hours for dye extraction. Then, the samples were centrifuged at 14.000 g for 45 minutes at 4°C and the supernatants were

collected. The concentration of extracted dye was determined by measuring the absorbance with a spectrophotometer at 620 nm, followed by a standard curve. The results were expressed as in μg of Evans blue/g of tissue [18,19].

Statistical Analysis

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). GraphPad Prism software (Graphpad Prism 5.0.1, San Diego, CA, USA) was used for statistical analyses and graphical presentation. Comparisons of groups were carried out through analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test for contractility studies or student's *t*-test for Evans blue extravasation assay and relative bladder weights. For CCh-induced concentration-response curves, the values of E_{max} (the maximum response) and the negative logarithm of the concentration to produce the half of maximal response (pEC_{50}) were calculated using nonlinear regression plots (GraphPad Prism version 5.0.1, GraphPad, San Diego, CA, USA).

RESULT AND DISCUSSION

VIL Attenuated the CCh-induced Contractions of Detrusor Strips in CP-induced OAB

CCh (10^{-8} - 10^{-4} M) produced concentration-dependent contractions in the strips of all groups (Figure 2a). In OAB group, the maximal contractile responses of detrusor strips to CCh (10^{-8} - 10^{-4} M) were significantly increased compared to control group mice ($p < 0.001$; $E_{\text{max}} = 747.00 \pm 43.43$ and 456.50 ± 39.45 mg tension/mg tissue, respectively), indicating that multiple injections of CP led to OAB in mice. Treatment with VIL at 50 mg/kg for 7 days caused a significant decrease in CCh-induced contractions in the detrusor strips of CP-injected mice compared to OAB group ($p < 0.05$; $E_{\text{max}} = 566.80 \pm 36.98$ and 747.00 ± 43.43 mg tension/mg tissue, respectively). Solifenacin, an approved drug for OAB, markedly decreased the maximum contractile response to CCh in CP-injected mice compared with OAB group ($p < 0.01$; $E_{\text{max}} = 547.10 \pm 55.27$ mg and 747.00 ± 43.43 mg tension/mg tissue, respectively). However, VIL treatment at 10 mg/kg failed to improve detrusor overactivity in CP-injected mice. In VIL50 group, CCh-induced contractile response was similar with control group ($p > 0.05$). No difference was observed in pEC_{50} values of all groups for CCh-induced contractions (Figure 2b and Table 1).

Table 1. E_{max} and pEC_{50} values for CCh-induced contractions of the detrusor strips from all groups

Groups	E_{max} (mg tension/mg tissue)	pEC_{50}
Control	456.50 ± 39.45	5.79 ± 0.16
OAB	$747.00 \pm 43.43^{**}$	5.84 ± 0.17
OAB + VIL10	$685.00 \pm 66.42^*$	5.73 ± 0.23
OAB + VIL50	$566.80 \pm 36.98^{\#}$	5.55 ± 0.11
OAB + SOL	$547.10 \pm 55.27^{\#}$	5.97 ± 0.19
VIL50	$495.90 \pm 65.07^{\#\#}$	5.55 ± 0.21

Data were expressed as mean \pm SEM (n = 6-8). $^{**}p < 0.01$, $^*p < 0.05$ compared with control group. $^{\#\#}p < 0.01$, $^{\#}p < 0.05$ compared with OAB group. CCh, carbachol; E_{max} , maximal contraction evoked by carbachol. OAB, overactive bladder; pD_2 , the negative logarithm of the EC_{50} ; SOL, solifenacin; VIL, vildagliptin

VIL Suppressed CP-induced Bladder Inflammation

In OAB group, CP injection significantly ($p < 0.01$) increased evans blue extravasation in the bladders compared to control group (48.25 ± 4.28 and 18.28 ± 6.92 $\mu\text{g/g}$ of tissue, respectively), which was markedly ($p < 0.05$) blunted by VIL treatment at 50 mg/kg (30.24 ± 3.57 $\mu\text{g/g}$ of tissue). However, treatment with solifenacin (35.20 ± 6.35 $\mu\text{g/g}$ of tissue) or VIL at 10 mg/kg (42.00 ± 9.47 $\mu\text{g/g}$ of tissue) did not alter evans blue extravasation stimulated by CP (Figure 3a). In addition, we determined relative bladder weights of all groups for the assessment of bladder hypertrophy as a hallmark of bladder inflammation. The relative bladder weight dramatically increased in OAB group (0.83 ± 0.03) compared to control group (0.60 ± 0.02 , $p < 0.001$). VIL treatment at 50 mg/kg caused a significant ($p < 0.05$) decrease in relative bladder weight compared to OAB group (0.71 ± 0.01 and 0.83 ± 0.03 , respectively).

Solifenacin (0.83 ± 0.02) or VIL at 10 mg/kg (0.86 ± 0.04) did not reduce the relative bladder weight of the mice with OAB (Figure 3b). The body weights of mice were similar among groups.

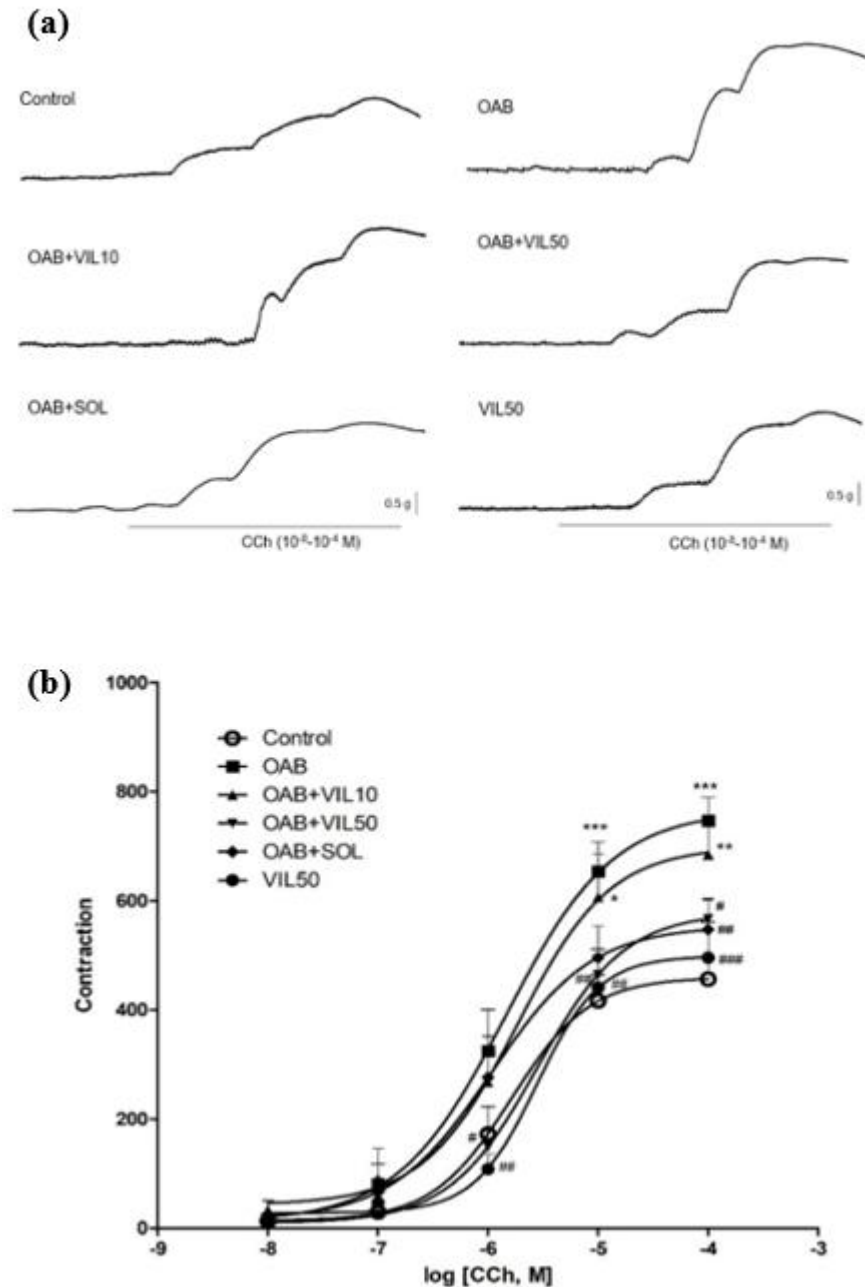


Figure 2. VIL improved detrusor overactivity in mice with OAB induced by CP. (a) Representative original traces of CCh-induced contractions of the detrusor strips in all groups. (b) Cumulative concentration-response curves for CCh (10^{-8} - 10^{-4} M). Data were expressed as mean \pm SEM (n=6-8). *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05 compared with control group. ### p <0.001, ## p <0.01, # p <0.05 compared with OAB group. CCh, carbachol; OAB, overactive bladder; SOL, solifenacin; VIL, vildagliptin

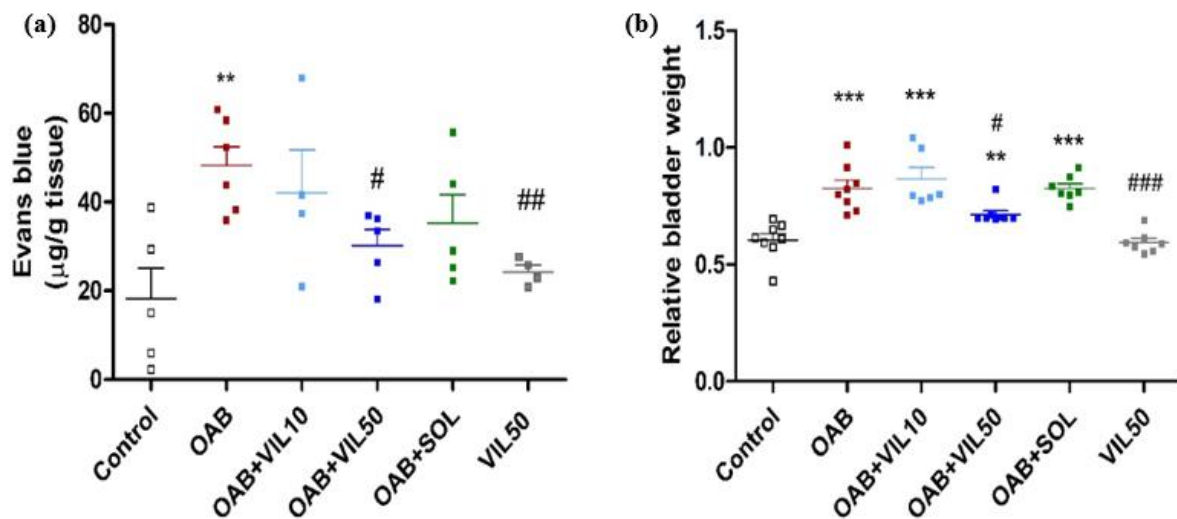


Figure 3. VIL attenuated bladder inflammation in mice with OAB induced by CP. (a) Quantitative analysis of Evans blue leakage. (b) The relative bladder weights of all groups. Data were expressed as mean \pm SEM (n=4-8). ***p<0.01, **p<0.01 compared with control group. ###p<0.001, ##p<0.01, #p<0.05 compared with OAB group. OAB, overactive bladder; SOL, solifenacin; VIL, vildagliptin

OAB is a urological syndrome typically manifested by bothersome symptoms of urgency, with or without urge incontinence, and often accompanied with increased urinary frequency and nocturia, resulting in impaired social functioning and quality of life. It is a common urological disease with an overall prevalence of around 17%, mostly affecting elderly people [1,20]. OAB is considered to be caused by multiple factors related with functional alterations in bladder, mainly leading to involuntary detrusor contractions defined as detrusor overactivity. However, the precise etiology of OAB has not largely understood [21]. Currently available pharmacological agents for OAB including anti-muscarinics and β_3 agonists have reported to be associated with several side effects and limited efficacy. Therefore, physiopathological mechanisms of OAB has been under intense investigation to discover novel therapeutic targets, and thus to develop new drugs [22]. Bladder inflammation has gained a remarkable interest, which has a direct effect on bladder contractility [23]. Several lines of evidence suggests that various inflammatory process or cytokines are involved in the pathogenesis of OAB [2]. Until now, experimental studies have reported that OAB is linked to bladder inflammation and anti-inflammatory agents have efficacy in OAB models [24,25]. Moreover, elevated levels of urine cytokines and the signs of inflammation in bladder specimens have been detected in the patients with OAB [26]. Therefore, anti-inflammatory-based approaches may offer hope for the treatment of OAB [27].

DPP-4 inhibitors including sitagliptin, vildagliptin (VIL), saxagliptin, alogliptin, linagliptin, dutogliptin etc. are a class of drugs widely used for the treatment of type 2 diabetes. They are highly effective in glucose-lowering by inhibiting the enzymatic degradation of incretins, thus amplifying the effects of incretins. Due to their favorable safety and efficacy profile, they have become one of the most preferred anti-diabetic drugs [28,29]. In recent years, the anti-inflammatory potential of DPP-4 inhibitors have attracted more attention beyond glycemic control [30,31]. VIL, a well-known DPP-4 inhibitor, has been also reported to suppress inflammation in various *in vivo* and *in vitro* models [9-12]. Liu and Qia showed that VIL treatment (10 mg/kg for 21 days) significantly decreased the expression of pro-inflammatory cytokines and the infiltration of inflammatory cells in lung tissues of bleomycin-treated mice [9]. Also, in a rat model of cyclosporine A-induced hepatotoxicity, VIL treatment (10 mg/kg for 28 days) improved liver inflammation by suppressing the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) activity [10]. In another study conducted by Sherif et al., VIL was reported to exhibit hepatoprotective effect by reducing inflammation through the downregulation of TLR4/NF- κ B signaling pathway in a rat model of hepatic ischemia/reperfusion injury [11]. Moreover, treatment with VIL (5 or 10 mg/kg for 21 days) attenuated colonic inflammation by inhibiting PI3K/Akt/NF κ B pathway in rats with colitis

induced by acetic acid [12]. However, the effect of VIL on bladder inflammation is completely unknown.

CP-induced bladder inflammation is a widely used and well-established experimental model for OAB. Several studies have reported that multiple injections of CP cause voiding dysfunction similar to the symptoms of OAB syndrome in mice [4-6]. Acrolein, the urotoxic metabolite of CP, leads to urothelial injury resulting in inflammation and bladder dysfunction [4,32].

In the present study, we investigated the effect VIL on CP-induced OAB. To test the effect of VIL on detrusor contractility, we evaluated *ex vivo* contraction of the strips to CCh by using isolated tissue bath. In addition, we used Evans blue extravasation assay to test the effect of VIL on bladder inflammation induced by CP. To our results, four injections of CP significantly increased the CCh-induced contraction of detrusor strips in line with previous studies [33,34]. The increase in CCh-induced contraction was blunted by solifenacin, a potent and long acting anti-muscarinic drug. We also found that high dose of VIL (50 mg/kg) caused a marked decrease in CCh-induced contractile response of the strips in CP-treated mice. Furthermore, we found that CP significantly increased evans blue extravasation into bladder tissue and relative bladder weight, indicating that CP caused inflammation in bladder tissue, which is similar to previous studies [14,35,36]. Solifenacin did not ameliorate bladder inflammation although it was effective in attenuating detrusor overactivity in CP-treated mice, demonstrating that solifenacin offers symptomatic treatment in CP-induced OAB model. However, high dose of VIL (50 mg/kg) considerably reduced extravasation and relative bladder weight as well as the CCh-induced contractions of the strips in CP-treated mice. This finding suggests that VIL could interfere with bladder inflammation underlying detrusor overactivity in CP-induced OAB model. All together, our results demonstrated that treatment with VIL (50 mg/kg/day for 7 days) effectively improved detrusor contractility by partially suppressing bladder inflammation in a mouse model of CP-induced OAB.

Despite providing evidence for the effect of VIL on CP-induced OAB, our study has certain limitations. In the present study, the molecular mechanisms of VIL mediating its anti-inflammatory effect has not been identified. Further studies are needed to test the role of signaling pathways such as PI3K/Akt/NF κ B, TLR4/NF- κ B etc. in the therapeutic effect of VIL. In addition, the level of the expression of pro-inflammatory cytokines can be directly measured in the bladder tissues to support the reported anti-inflammatory effect of VIL.

Overall, the present study provides the first evidence that VIL has beneficial effect in CP-induced OAB by suppressing bladder inflammation. Our results suggest that VIL might be repurposed as a promising therapeutic candidate for the treatment of OAB. Therefore, further molecular and clinical studies are needed to identify the mechanism of these effects and confirm current preclinical results in the future research.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: S.E.; Design: S.E.; Control: S.E., E.N.B.; Sources: S.E., E.N.B.; Materials: S.E., E.N.B.; Data Collection and/or Processing: S.E., E.N.B., M.I.K., M.N.Y.; Analysis and/or Interpretation: S.E., E.N.B.; Literature Review: S.E., M.I.K., M.N.Y.; Manuscript Writing: S.E.; Critical Review: S.E., E.N.B., M.I.K., M.N.Y.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

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

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

All experimental procedure of the animals was approved by Animal Experiments Local Ethics Committee of Karadeniz Technical University (Approval no: 2023/45).

REFERENCES

1. Peyronnet, B., Mironska, E., Chapple, C., Cardozo, L., Oelke, M., Dmochowski, R., Amarenco, G., Gamé, X., Kirby, R., Van Der Aa, F., Cornu, J.N. (2019). A comprehensive review of overactive bladder pathophysiology: On the way to tailored treatment. *European Urology*, 75(6), 988-1000. [\[CrossRef\]](#)
2. Latini, J.M., Giannantoni, A. (2011). Pharmacotherapy of overactive bladder: Epidemiology and pathophysiology of overactive bladder. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 12(7), 1017-1027. [\[CrossRef\]](#)
3. Grundy, L., Caldwell, A., Brierley, S.M. (2018). Mechanisms underlying overactive bladder and interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 931. [\[CrossRef\]](#)
4. Boudes, M., Uvin, P., Kerselaers, S., Vennekens, R., Voets, T., De Ridder, D. (2011). Functional characterization of a chronic cyclophosphamide-induced overactive bladder model in mice. *Neurourology and Urodynamics*, 30(8), 1659-1665. [\[CrossRef\]](#)
5. Chen, Y.H., Chen, W.C., Liu, P.L., Chen, H.Y. (2020). Astragalus polysaccharides and astragaloside IV ameliorates cyclophosphamide-induced mouse model of overactive bladder. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 59(2), 248-255. [\[CrossRef\]](#)
6. Zhang, S., Lv, J.W., Yang, P., Yu, Q., Pang, J., Wang, Z., Guo, H., Liu, S., Hu, J., Li, J., Leng, J., Huang, Y., Ye, Z., Wang, C.Y. (2012). Loss of dicer exacerbates cyclophosphamide-induced bladder overactivity by enhancing purinergic signaling. *The American Journal of Pathology*, 181(3), 937-946. [\[CrossRef\]](#)
7. Shen, J.D., Chen, S.J., Chen, H.Y., Chiu, K.Y., Chen, Y.H., Chen, W.C. (2021). Review of animal models to study urinary bladder function. *Biology*, 10(12), 1316. [\[CrossRef\]](#)
8. Kang, S.M., Park, J.H. (2021). Pleiotropic benefits of DPP-4 inhibitors beyond glycemic control. *Clinical medicine insights. Endocrinology and Diabetes*, 14, 11795514211051698. [\[CrossRef\]](#)
9. Liu, Y., Qi, Y. (2020). Vildagliptin, a CD26/DPP4 inhibitor, ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via regulating the extracellular matrix. *International Immunopharmacology*, 87, 106774. [\[CrossRef\]](#)
10. El-Sherbeeny, N.A., Nader, M.A. (2016). The protective effect of vildagliptin in chronic experimental cyclosporine A-induced hepatotoxicity. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94(3), 251-256. [\[CrossRef\]](#)
11. Sherif, I.O., Al-Shaalan, N.H. (2018). Vildagliptin attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury via the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 3509091. [\[CrossRef\]](#)
12. Fouad, M.R., Salama, R.M., Zaki, H.F., El-Sahar, A.E. (2021). Vildagliptin attenuates acetic acid-induced colitis in rats via targeting PI3K/Akt/NF κ B, Nrf2 and CREB signaling pathways and the expression of lncRNA IFNG-AS1 and miR-146a. *International Immunopharmacology*, 92, 107354. [\[CrossRef\]](#)
13. Zhang, Y., Zhang, X., Wee Yong, V., Xue, M. (2022). Vildagliptin improves neurological function by inhibiting apoptosis and ferroptosis following intracerebral hemorrhage in mice. *Neuroscience Letters*, 776, 136579. [\[CrossRef\]](#)
14. Liu, M., Shen, S., Kendig, D.M., Mahavadi, S., Murthy, K.S., Grider, J.R., Qiao, L.Y. (2015). Inhibition of NMDAR reduces bladder hypertrophy and improves bladder function in cyclophosphamide induced cystitis. *The Journal of Urology*, 193(5), 1676-1683. [\[CrossRef\]](#)
15. de Oliveira, M.G., Calmasini, F.B., Alexandre, E.C., De Nucci, G., Mónica, F.Z., Antunes, E. (2016). Activation of soluble guanylyl cyclase by BAY 58-2667 improves bladder function in cyclophosphamide-induced cystitis in mice. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 311(1), 85-93. [\[CrossRef\]](#)
16. Engin, S., Barut, E.N., Erac, Y., Sari, S., Kadioglu, M. (2023). The inhibitory effect of escitalopram on mouse detrusor contractility: The role of L-type calcium channels. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 461, 116408. [\[CrossRef\]](#)
17. Barut, E.N., Öztürk, A.C., Engin, S., Renda, G. (2023). Investigation of the effects of oleuropein on mouse detrusor muscle contractility. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(1), 81-90. [\[CrossRef\]](#)
18. Radu, M., Chernoff, J. (2013). An *in vivo* assay to test blood vessel permeability. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (73), e50062. [\[CrossRef\]](#)
19. Hughes, F.M., Jr, McKeithan, P., Ellett, J., Armeson, K.E., Purves, J.T. (2013). Simvastatin suppresses cyclophosphamide-induced changes in urodynamics and bladder inflammation. *Urology*, 81(1), 209.e9-209.e2.09E14. [\[CrossRef\]](#)
20. Wein, A.J., Rackley, R.R. (2006). Overactive bladder: A better understanding of pathophysiology, diagnosis and management. *The Journal of Urology*, 175(3 Pt 2), 5-10. [\[CrossRef\]](#)
21. Palmer, C.J., Choi, J.M. (2017). Pathophysiology of overactive bladder: Current understanding. *Current Bladder Dysfunction Reports*, 12(1), 74-79. [\[CrossRef\]](#)
22. Hutchinson, A., Nesbitt, A., Joshi, A., Clubb, A., Perera, M. (2020). Overactive bladder syndrome: Management and treatment options. *Australian Journal of General Practice*, 49(9), 593-598. [\[CrossRef\]](#)

23. Grover, S., Srivastava, A., Lee, R., Tewari, A.K., Te, A.E. (2011). Role of inflammation in bladder function and interstitial cystitis. *Therapeutic Advances in Urology*, 3(1), 19-33. [\[CrossRef\]](#)
24. Ishizuka, Y., Satake, Y., Kimura, S., Yamashita, S., Kawamorita, N., Ito, A. (2024). Statin administration ameliorates ischemia-induced overactive bladder with improvement of blood flow and anti-inflammatory effects in rats. *Neurourology and Urodynamics*, 43(4), 991-1002. [\[CrossRef\]](#)
25. Wróbel, A., Serefko, A., Bańcerowska-Górska, M., Szopa, A., Dudka, J., Poleszak, E. (2019). Intravesical administration of blebbistatin prevents cyclophosphamide-induced toxicity of the urinary bladder in female Wistar rats. *Neurourology and Urodynamics*, 38(4), 1044-1052. [\[CrossRef\]](#)
26. Tyagi, P., Barclay, D., Zamora, R., Yoshimura, N., Peters, K., Vodovotz, Y., Chancellor, M. (2010). Urine cytokines suggest an inflammatory response in the overactive bladder: A pilot study. *International Urology and Nephrology*, 42(3), 629-635. [\[CrossRef\]](#)
27. Chess-Williams, R., Sellers, D.J. (2023). Pathophysiological mechanisms involved in overactive bladder/detrusor overactivity. *Current Bladder Dysfunction Reports*, 18(2), 79-88. [\[CrossRef\]](#)
28. Sun, Z.G., Li, Z.N., Zhu, H.L. (2020). The research progress of DPP-4 Inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 20(17), 1709-1718. [\[CrossRef\]](#)
29. Cahn, A., Cernea, S., Raz, I. (2016). An update on DPP-4 inhibitors in the management of type 2 diabetes. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 21(4), 409-419.
30. Yazbeck, R., Howarth, G.S., Abbott, C.A. (2009). Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(11), 600-607. [\[CrossRef\]](#)
31. Tomovic, K., Lazarevic, J., Kocic, G., Deljanin-Ilic, M., Anderluh, M., Smelcerovic, A. (2019). Mechanisms and pathways of anti-inflammatory activity of DPP-4 inhibitors in cardiovascular and renal protection. *Medicinal Research Reviews*, 39(1), 404-422. [\[CrossRef\]](#)
32. Mills, K.A., Chess-Williams, R., McDermott, C. (2019). Novel insights into the mechanism of cyclophosphamide-induced bladder toxicity: Chloroacetaldehyde's contribution to urothelial dysfunction *in vitro*. *Archives of Toxicology*, 93(11), 3291-3303. [\[CrossRef\]](#)
33. Liu, Q., Long, Z., Dong, X., Zhang, T., Zhao, J., Sun, B., Zhu, J., Li, J., Dang, Q., Yangi, Z., Hu, X., Li, L. (2017). Cyclophosphamide-induced HCN1 channel upregulation in interstitial Cajal-like cells leads to bladder hyperactivity in mice. *Experimental & Molecular Medicine*, 49(4), e319. [\[CrossRef\]](#)
34. Saima-Anjum, I., Najm, S., Barkat, K., Nafidi, H.A., Bin Jardan, Y.A., Bourhia, M. (2023). Caftaric acid ameliorates oxidative stress, inflammation, and bladder overactivity in rats having interstitial cystitis: An *in silico* study. *ACS Omega*, 8(31), 28196-28206. [\[CrossRef\]](#)
35. Wróbel, A., Doboszewska, U., Rechberger, E., Rojek, K., Serefko, A., Poleszak, E., Skalicka-Woźniak, K., Dudka, J., Wlaź, P. (2017). Rho kinase inhibition ameliorates cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 390(6), 613-619. [\[CrossRef\]](#)
36. Chow, Y.C., Yang, S., Huang, C.J., Tzen, C.Y., Huang, P.L., Su, Y.H., Wang, P.S. (2006). Epinephrine promotes hemostasis in rats with cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *Urology*, 67(3), 636-641. [\[CrossRef\]](#)



ACINETOBACTER BAUMANNII İZOLATLARINDA DNA GYRASE DİRENÇ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF DNA GYRASE RESISTANCE GENES IN ACINETOBACTER BAUMANNII ISOLATES

Uğur KAYIŞ^{1*} , Tammam SİPAHİ² , Suzan ÖKTEN³ ,
Fatma KAYNAK ONURDAĞ³ 

¹Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Pazaryeri Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri, 11800, Bilecik, Türkiye

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

³Trakya Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, 22030, Edirne, Türkiye

ÖZ

Amaç: Hastane ortamındaki antimikrobiyal ajanlara dirençli bakterilerin topluma yayılabileceği bilinmektedir. *Acinetobacter baumannii*, antibiyotik direnç genleri sebebiyle tedavisi oldukça zor olan bir mikroorganizmadır. Florokinolonlar da dahil olmak üzere birçok antibiyotiğe dirençlidir. *A. baumannii*'nin kinolon direnci DNA giraz ve topoizomerez IV genlerindeki mutasyonlarının belirlenmesiyle tespit edilir. Çalışmamızda Real Time PCR yöntemi kullanılarak, *A. baumannii* izolatlarında kinolon direncine sebep olan (*gyrA*, *gyrB*, *parC*) DNA giraz direnç genlerine ait mutasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 73 adet *A. baumannii* dirençli klinik izolatu kullanıldı. *A. baumannii* *gyrA*, *parC*, *gyrB* genlerine ait primerler kullanılarak amplifiye edildi. HRM analizi kullanarak *gyrA*, *gyrB*, *parC* geni Real-Time PCR ampliconları DNA sekanslarına göre gruplara ayrıldı. *A. baumannii* izolatları farklı HRM profillerine göre P1, P2, P3, GA1, GA2, GA3, GB1 ve GB2 olarak gruplandırıldı ve her gruptan 2 farklı Real-Time PCR ürününün DNA dizi analizi yapıldı.

Sonuç ve Tartışma: GA1, GA2, GA3 genotipinde mutasyonu tespit edildi. P1, P2, P3 ve GB1, GB2 genotiplerinde mutasyon gözlemlenmedi.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, DNA giraz, HRM, RT-PCR

ABSTRACT

Objective: It is known that bacteria resistant to antimicrobial agents can spread to the community in the hospital environment. *Acinetobacter baumannii* is a difficult-to-treat pathogen due to its antibiotic resistance genes. It is resistant to many antibiotics, including fluoroquinolones. By identifying mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes, quinolone resistance of *A. baumannii* is found. Our study, aimed to determine mutations in DNA gyrase resistance genes that cause quinolone resistance (*gyrA*, *gyrB*, *parC*) in *A. baumannii* isolates using the real-time PCR method.

Material and Method: 73 *A. baumannii* resistant clinical isolates were used in the study. *A. baumannii* was amplified using primers for *gyrA*, *parC*, *gyrB* genes. Using HRM analysis, *gyrA*, *gyrB*, *parC* gene Real-Time PCR amplicons were grouped according to their DNA sequences. *A. baumannii* isolates were grouped as P1, P2, P3, GA1, GA2, GA3, GB1 and GB2 according to

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Uğur Kayış
e-posta / e-mail: uur.kayis@gmail.com, Tel. / Phone: +905383365291

different HRM profiles, DNA sequence analysis of 2 different Real-Time PCR products from each group was performed.

Result and Discussion: Mutations were detected in GA1, GA2, GA3 genotypes. No mutations were observed in the P1, P2, P3 and, GB1, GB2 genotypes.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, DNA gyrase, HRM, RT-PCR

GİRİŞ

Acinetobacter türleri ürogenital sistemde, gastrointestinal sistemde, ağız içi florada, solunum yollarında ve deri florasında bulunur. *Acinetobacter baumannii* ise deri florasında az rastlanan bir tür olmasına rağmen sağlıklı kişilerin %40'ının taşıyıcı olduğu saptanmıştır [1]. Sağlıklı kişilerde az rastlanan bir türdür fakat hastanede yatan immün sistemi düşük ve yaşlı kişilerde hastane enfeksiyonlarına sebep olur [2]. *A. baumannii*, hastane enfeksiyonlarında sıkça rastlanan türlerden biridir [3]. *A. baumannii* dünyada antibiyotik direnci sebebiyle ölüme yol açan dördüncü türdür fakat standart bir tedavisi hala yoktur ve enfeksiyonlarının tedavisi kinolonlar, aminoglikozidler ve karbapenemler ile gerçekleştirilir. Çoğu antibiyotiğe dirençli olmasına rağmen en sık kinolonlara direnç gösterir [4-7]. Kinolonlar DNA giraz ve topoizomeraz IV enzim aktivitesini engelleyerek çalışır. Bu iki enzim tip II topoizomeraz olarak adlandırılır ve kromozom süpersarmalını kontrol eder. Kinolon grubu antibiyotikler DNA ipliğinin tekrar bağlanmasını engelleyip hücre bölünmesini durdurarak etki eder [8]. DNA giraz ve topoizomeraz IV'ü kodlayan genlerde oluşan mutasyonlar kinolon grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişmesine sebep olur. Özellikle DNA giraz alt birimi A (gyr A) ve topoizomeraz IV alt birimi C (par C) genlerinde meydana gelen mutasyonlar ilaç hedef bölgesindeki değişiklikleri sebebiyle kinolon direnci ile ilişkilendirilir [9]. *A. baumannii*'de siprofloksasin ve nalidiksik aside karşı direnç, gyrA ve parC'nin kinolon direncini belirleyen bölgelerindeki koromozom direnci ile meydana gelir. gyrA ve gyrB tarafından kodlanan DNA giraz, parC ve parE tarafından kodlanan topoizomeraz IV'da meydana gelen hedef enzimindeki değişikliğe sebep olan mutasyon en yaygın gözlemlenen ilaca direnç mutasyonudur. GyrA'daki tek amino asit değişikliği (Ser83Leu), siprofloksasin ve nalidiksik aside karşı yüksek düzeyde dirençle ilişkilidir. ParC'de çoğunlukla Ser80Leu olmak üzere ek bir amino asit değişikliği, *A. baumannii*'de daha yüksek dirençle ilişkilidir [10].

Bu çalışmamızda *A. baumannii* DNA Gyrase direnç genleri olan gyrA, gyrB ve parC'de meydana gelen mutasyonların neden olduğu ilaç direncinin Real Time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle araştırılmasını amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan 73 adet *A. baumannii* dirençli klinik izolatu, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edildi. Bu kültür örnekleri farklı klinik örneklerden izole edildi ve merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda otomatize sistem ile tanımlaması yapıldı. İzolatlar çalışmaya alınmadan önce API20E (Biomerieux) identifikasyonu kiti kullanılarak identifikasyonu doğrulandı. Daha sonra DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Tablo 1'de belirtildiği üzere, izolasyonu gerçekleştirilen örneklerde uygun primerler kullanılarak DNA giraz direncini kodlayan gyrA, gyrB ve parC gen bölgeleri amplifiye edildi.

Tablo 1. RT-PCR'de kullanılan gen bölgelerine ait primer dizileri

Gen bölgesi	Primer dizisi	
	Forward	Reverse
gyrA	5'-AAATCTGCCCGTGTTCGTTGGT-3'	5'-GCCATACCTACGGCGATACC-3'
gyrB	5'-CGTGCGCGCTTTGATAAAAT-3'	5'-ACAGTTACACGTGGCCAGTA-3'
parC	5'-ATGAGCGAGCTAGGCTTAAA -3'	5'-TTAAGTTGTCCTTGCCATTCA-3'

Cihazda optimizasyon şu şekilde ayarlanmıştır:

- 1 döngü 5 dk - 95 °C,
- 45 döngü 10 sn - 95 °C,
- 10 sn - 55°C,
- 20 sn - 72°C.

Sadece hedef bölgenin çoğaltıldığını belirlemek ve HRM analizi için, RT-PCR sırasında 65°C-95°C arasında 0.2 sn rampa hızı ile erime eğrisi analizi yapıldı. Biospeedy HRM Analyzer (Bioeksen, Türkiye) yazılımı ile, erime eğrisi verileri değerlendirildi. HRM analiz yöntemi, RT-PCR ile farklı kültürlerden çoğaltılan gen dizilerini DNA dizilimlerine göre gruplandırma yaptığı için tercih edildi. Dolayısıyla HRM analizinden yararlanılarak parC, gyrA ve gyrB genlerinin RT-PCR'da çoğaltılan bölgeleri DNA dizilerine göre gruplandırıldı. Yapılan analiz sonucunda ise *A. baumannii* kültürleri farklı HRM profillerine göre P1, P2, P3, GA1, GA2, GA3, GB1 ve GB2 olarak gruplara ayrıldı. Ayrılan gruplardan her bir gen bölgesi için iki adet örnek alındı ve sekans analizi yapıldı. Alınan örneklerin gen bankasında en çok benzer olduğu DNA dizilimlerinin verileri ise Tablo 2'de verildiği gibi sonuçlandı.

Tablo 2. Farklı genotiplerin DNA dizilimlerinin BLAST analizi sonuçları

Gen	Gen bankasında en çok benzediği DNA dizisi		
	Genotip	Numarası	Benzerlik yüzdesi (%)
gyrA	GA1	EU886740.1	100
	GA2	DQ270238.1	99
	GA3	AY596923.1	100
parC	P1	CP010779.1	98
	P2	CP010779.1	97
	P3	CP007549.3	97
gyrB	GB1	CP000863.1	100
	GB2	AP014649.1	99

Dizi analizleri, ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit kullanılarak Sanger yöntemiyle, ABI Prism 377 DNA Sequencer'da belirlendi [11]. Dizi analizi iki yönlü uygulandı ve ulaşılan diziler 4peaks yazılımı kullanılarak değerlendirildi. NCBI BLAST programı vasıtasıyla, dizilerin DNA Data bankasında en çok benzer olduğu dizilerin yüzdeleri belirlendi [12,13]. Son olarak, Clustal W2 ile elde edilen dizilerdeki parC (S80L, S80W ve S84K), gyrA (S83L), ve gyrB (E479D, D644Y ve A677V) mutasyonları karşılaştırmalı olarak incelendi [14].

SONUÇ VE TARTIŞMA

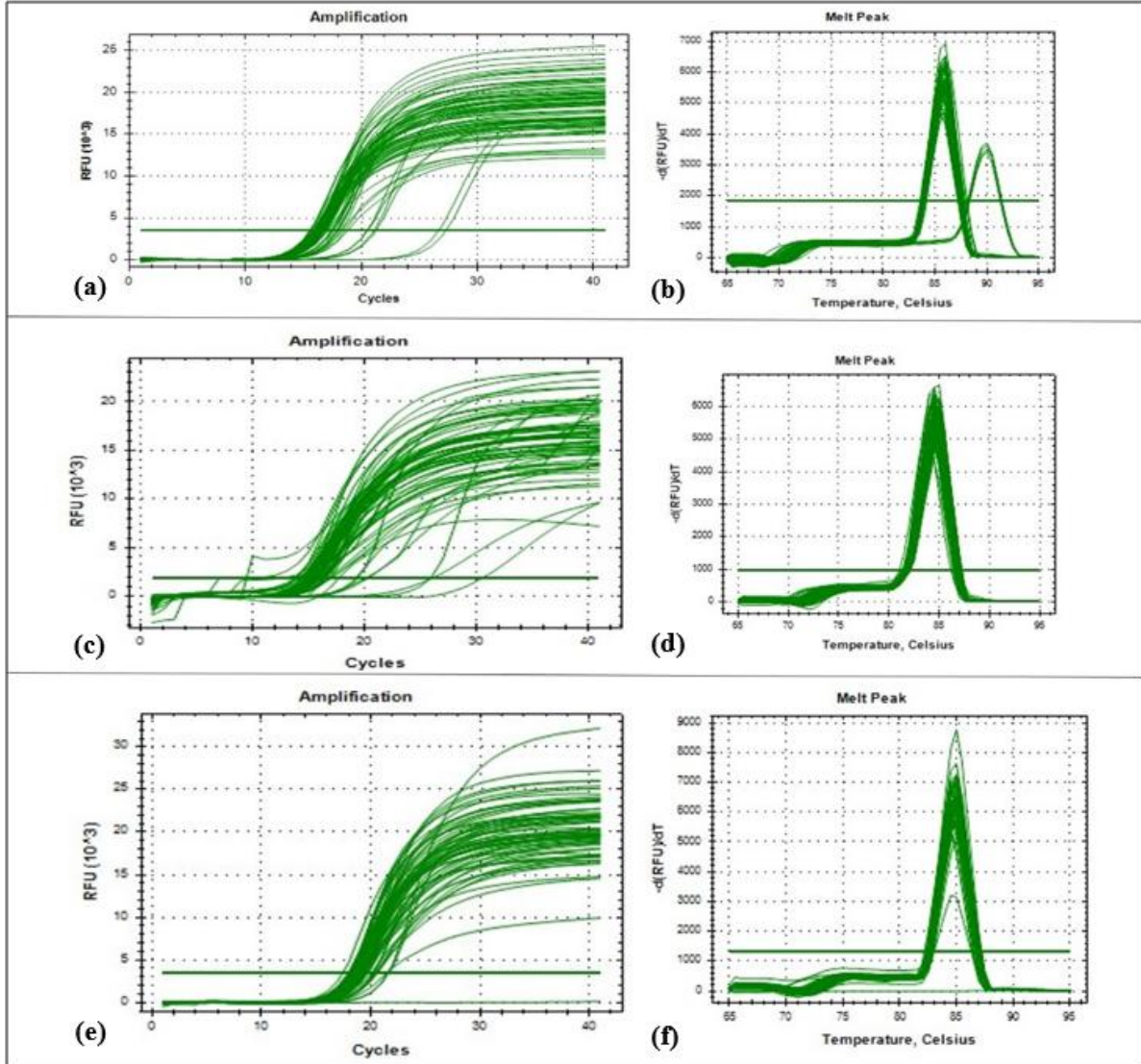
Şekil 1'de RT-PCR uygulanan genlerin erime ve çoğalma eğrileri verilmiştir. Negatif kontrol örneklerde çoğalma tespit edilmemiştir. RT-PCR sonuçlarında, Ct sonuçlarının 30 altında olması ve Tm sonuçlarının ise sabit olması uygun genlerin doğru çoğaldığını göstermektedir.

Farklı kültürlerden elde edilen genlerin DNA dizilimine göre gruplandırması HRM analizi ile yapılmıştır. RT-PCR ile çoğaltılan DNA ürünleri HRM profilleri Şekil 2'de verilmiştir. Tablo 3'te ise HRM gruplandırması verilmiştir.

HRM gruplarına göre oluşan iki adet örneğin DNA dizisi çıkarılmıştır. DNA dizileri her bir grup için aynı DNA dizilimini göstermiştir.

Elde edilen dizilerde parC S80(TCG)'nin L80(TTG) veya W80(TGG) mutasyonu, E84(GAA)'nin K84(AAA) mutasyonu; gyrA S83(TCA)'in L83 (TTA) mutasyonu; ve gyrB E479(GAA)'nin D479(GAT) mutasyonu, D644(GAT)'nin Y644(TAT) mutasyonu, A677(GCG)'nin V677(GTG) mutasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada elde edilen DNA dizileri ile mutasyon içermeyen referans diziler Clustal W2 programı ile karşılaştırılmış böylece hangi dizilerin mutasyon içerdiği tespit edilmiştir. parC için referans dizi gen bankası ulaşım numarası HM570038.1, gyrA için

referans dizi gen bankası ulaşım numarası DQ270238.1 ve gyrB için referans dizi gen bankası ulaşım numarası CU468230.2'dir. DNA karşılaştırmaları ve referans gen dizilimleri Şekil 3, Şekil 4 ve Şekil 5'te verilmiştir. Sarı ile işaretlenmiş bölgeler, DNA dizilimleri üzerinde analiz edilecek mutasyon noktaları olarak belirtilmiştir. Şekillerdeki verilere göre, GA2, GA1, ve GA3 genotipinin her üçünde de S83 (TCA)'in L83 (TTA) mutasyonu tespit edilmiş iken parC ve gyrB genotiplerinde mutasyon gözlemlenmemiştir.

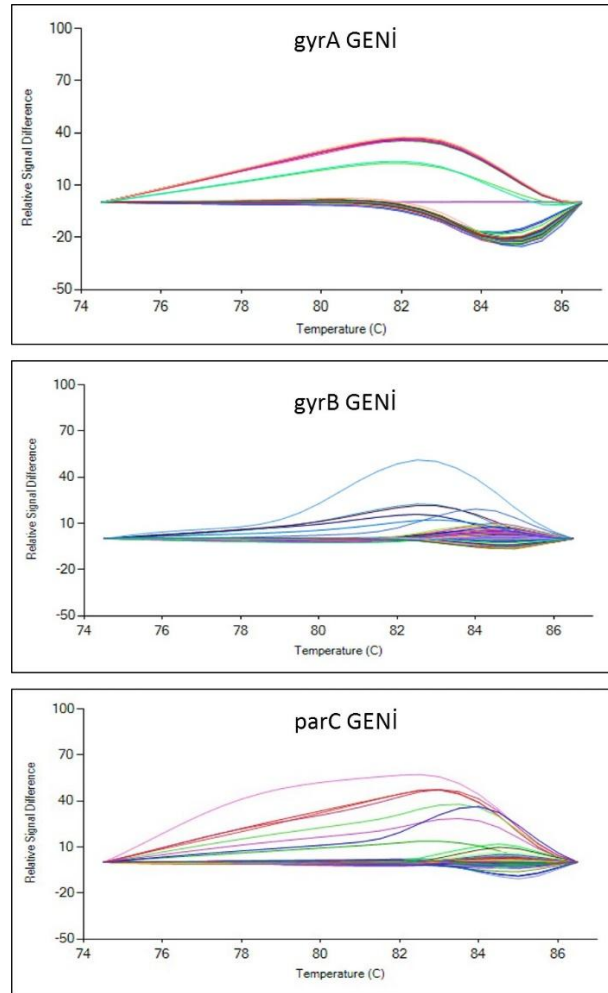


Şekil 1. RT-PCR çoğalma (a, c, e) ve erime (b, d, f) eğrileri; (a-b): gyrA hedefli, (c-d): gyrB hedefli, (e-f): parC hedefli

2009 yılında Wang-Huei Sheng ve ark. tarafından, Tayvan Taipei hastanesinde 2005-2006 yılları arasında 82 adet izole edilen *A. baumannii* üzerinde çalışma yapılmıştır. Siprofloksasin duyarlılık testleri sonucunda ise, 49 adet *A. baumannii* izolatının gyrA geninde Leu83 (TTA) mutasyonuna rastlanmıştır. Ser83 (TCA)-Leu83 (TTA) mutasyonunu siprofiloksisine karşı direnç gelişimini desteklediği şeklinde değerlendirilmiştir. Çalışmamızdaki S83 (TCA)-L83 (TTA) mutasyonu ile Wang-Huei Sheng ve ark. tarafından yapılan çalışma ile uyumludur [15].

Mohamed Elshahat ve ark. 2021 yılında Al-Azhar Üniversitesinden 100 *A. baumannii* izolatu üzerinde çalışmıştır. Çalışmada gyrA, gyrB, parC ve parE alt birimlerini kodlayan genlerdeki mutasyonu

saptanmıştır. Sonucunda ise florokinolonlara dirençli *A. baumannii*'de en sık *gyrA* ve *parC* mutasyonları tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki *gyrA* mutasyonu ile örtüşmektedir [16].



Şekil 2. RT-PCR amplikonlarından elde edilen HRM profilleri

Tablo 3. RT-PCR amplikonlarından elde edilen HRM profillerine göre gruplandırma

Genotip Grubu		Numune No
gyrA	GA1	3,4,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,58,59,61,62,75,76,77,78,79,81,82,84,86,87,88.
	GA2	5,57,60,80,85.
	GA3	1,2.
gyrB	GB1	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,28,29,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,58,59,61,62,75,76,77,78,79,80,81,82,84,85,86,87,88.
	GB2	30,57,60.
parC	P1	1,2,3,4,6,7,8,9,10,11,14,15,17,18,19,20,21,22,24,25,26,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,75,76,77,78,79,81,82,84,85,86,87,88.
	P2	12,13,23.
	P3	5,80.

GA2	-----TATCACCCGCATGGTGACTTAGCT	24
DQ270238.1	AAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGSTAAATATCACCCGCATGGTGACTTAGCT	60
GA1	-----CCCATGGTGACTTAGCT	17
GA3	AAATCTGCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGSTAAATATCACCCGCATGGTGACTTAGCT	60
GA2	GTTTATGAAACCATTGTTCGTAATGGCTCAAGACTTTAGCTTACGTTATTTATTGGTTGAT	84
DQ270238.1	GTTTATGAAACCATTGTTCGTAATGGCTCAAGACTTTAGCTTACGTTATTTATTGGTTGAT	120
GA1	GTTTATGAAACCATTGTTCGTAATGGCTCAAGACTTTAGCTTACGTTATTTATTGGTTGAT	77
GA3	GTTTATGAAACCATTGTTCGTAATGGCTCAAGACTTTAGCTTACGTTATTTATTGGTTGAT	120
GA2	GGTCAGGGTAACTTCGGTTCGATCGATGGTGATAGCGCTGCCGCAATGTGTTATAACCGAA	144
DQ270238.1	GGTCAGGGTAACTTCGGTTCGATCGATGGTGATAGCGCTGCCGCAATGTGTTATAACCGAA	180
GA1	GGTCAGGGTAACTTCGGTTCGATCGATGGTGATAGCGCTGCCGCAATGTGTTATAACCGAA	137
GA3	GGTCAGGGTAACTTCGGTTCGATCGATGGTGATAGCGCTGCCGCAATGTGTTATAACCGAA	180
GA2	GTCGSTATGAATAAGCTGGCACATGAGCTTCTTGCAGATTTAGAAAAAGCACAGTTGAC	204
DQ270238.1	GTCGSTATGAATAAGCTGGCACATGAGCTTCTTGCAGATTTAGAAAAAGCACAGTTGAC	240
GA1	GTCGSTATGAATAAGCTGGCACATGAGCTTCTTGCAGATTTAGAAAAAGCACAGTTGAC	197
GA3	GTCGSTATGAATAAGCTGGCACATGAGCTTCTTGCAGATTTAGAAAAAGCACAGTTGAC	240
GA2	TGGGAAGATAACTACGACGGTTCGGAACGTATCCCTGAAGTACTTCCGACACGTGTTCCA	264
DQ270238.1	TGGGAAGATAACTACGACGGTTCGGAACGTATCCCTGAAGTACTTCCGACACGTGTTCCA	300
GA1	TGGGAAGATAACTACGACGGTTCGGAACGTATCCCTGAAGTACTTCCGACACGTGTTCCA	257
GA3	TGGGAAGATAACTACGACGGTTCGGAACGTATCCCTGAAGTACTTCCGACACGTGTTCCA	300
GA2	AACITGTTAATTAACGGTGTCTGCTGGTATCGC-----	296
DQ270238.1	AACITGTTAATTAACGGTGTCTGCTGGTATCGC-----	344
GA1	AACITGTTAATTAACGGTGTCTGCTGGTATCGC-----	289
GA3	AACITGTTAATTAACGGTGTCTGCTGGTATCGC-----	339

Şekil 3. gyrA DNA dizilimi karşılaştırılması

P3	ATGAGCGAGCTAGGCTTAAAAAGCAGTGGCAAGCCAAAAAATCAGCGCGTACAGTGGGT	60
P2	ATGAGCGAGCTAGGCTTAAAAAGCAGTGGCAAGCCAAAAAATCAGCGCGTACAGTGGGT	60
P1	ATGAGCGAGCTAGGCTTAAAAAGCAGTGGCAAGCCAAAAAATCAGCGCGTACAGTGGGT	60
HMS70038.1	ATGAGCGAGCTAGGCTTAAAAAGCAGTGGCAAGCCAAAAAATCAGCGCGTACAGTGGGT	60
P3	GATGTACTTGGTAAATACCACCCACATGGTGACTATGCATGTTATGAAGCCATGGTACTC	120
P2	GATGTACTTGGTAAATACCACCCACATGGTGACTATGCATGTTATGAAGCCATGGTACTC	120
P1	GATGTACTTGGTAAATACCACCCACATGGTGACTATGCATGTTATGAAGCCATGGTACTC	120
HMS70038.1	GATGTACTTGGTAAATACCACCCACATGGTGACTATGCATGTTATGAAGCCATGGTACTC	120
P3	ACGGCTTCGACATTTAGTTACCGCTATCCTTTAATCGAAGGTGAGGGGAACGTTGGTTCA	180
P2	ACGGCTTCGACATTTAGTTACCGCTATCCTTTAATCGAAGGTGAGGGGAACGTTGGTTCA	180
P1	ATGGCTCAGACATTTAGTTACCGCTATCCTTTAATCGAAGGTGAGGGGAACGTTGGTTCA	180
HMS70038.1	ATGGCTCAGACATTTAGTTACCGCTATCCTTTAATCGAAGGTGAGGGGAACGTTGGTTCA	180
P3	CCAGATGATCCTAAATCTTTTCTGCGATGCGTTATACCGAAGCCAAACTTTCGGCTTAT	240
P2	CCAGATGATCCTAAATCTTTTCTGCGATGCGTTATACCGAAGCCAAACTTTCGGCTTAT	240
P1	CCAGATGATCCTAAATCTTTTCTGCGATGCGTTATACCGAAGCCAAACTTTCGGCTTAT	240
HMS70038.1	CCTGATGATCCTAAATCTTTTCTGCGATGCGTTATACCGAAGCCAAACTTTCGGCTTAT	240
P3	AGTGAATTATTGCTGAGCGAATTAGGTGAGGGCACTAGTGAATGGCAGGACAAC	294
P2	AGTGAATTATTGCTGAGCGAATTAGGTGAGGGCACTAGTGAATGGCAGGACAAC	294
P1	AGTGAATTATTGCTGAGCGAATTAGGTGAGGGCACTAGTGAATGGCAGGACAAC	294
HMS70038.1	AGTGAATTATTGCTGAGCGAATTAGGTGAGGGCACTAGTGAATGGCAGGACAAC	294

Şekil 4. parC DNA dizilimi karşılaştırılması

Choong Ki Hong ve ark. 2017-2019 yılları arasında 98 *A. baumannii* izolatu ile çalışmıştır. Yapılan çalışmada gyrA ve ParC sekans analizine bakılmıştır. *A. baumannii*'nin 50 suşunun tamamında gyrA dizisinde Ser83 (TCA)'ün Leu83 (TTA)'ye yer değiştirdiği sonucuna varılmış, 43 suşta parC dizisinde Ser80 (TCG)'ün Leu (TTG) ile yer değiştirdiği sonucuna ulaşılmıştır. Bizim çalışmamızda gyrA dizisinde Ser83 (TCA)'ün Leu83 (TTA)'ye yer değiştirdiği sonucuyla örtüşmekte fakat çalışmada bulunan parC mutasyonu bizim çalışmamızla örtüşmemektedir [17].

Enas A. Tantawy ve ark. 2020 yılında yaptığı çalışmada 106 yoğun bakım hastasından izole edilen *A. baumannii* izolatu üzerinde çalışmıştır. Yapılan çalışmada gyrA ve parC mutasyonlarını taramış ve her iki gen bölgesinde de tüm kültürlerde gyrA dizisinde Ser83 (TCA) - Leu83 (TTA), parC

dizisinde ise Ser80 (TCG) - Leu (TTG) mutasyonuna rastlamıştır. Bizim çalışmamızda S83 (TCA)'in L83 (TTA) mutasyonu belirlenmiştir. Yapılan çalışma gyrA dizisinde Ser83 (TCA) - Leu83 (TTA) mutasyonu ile örtüşmekte fakat parC mutasyonu sonucumuz örtüşmemektedir [18].

GB1	TTCCGTCAAATGCCGGAGTTGGTGGAACTGGTCATATTTATATTGCACAGCCACCTTTG	240
GB2	TTCCGTCAAATGCCGGAGTTGGTGGAACTGGTCATATTTATATTGCACAGCCACCTTTG	240
CU468230.2	TTCCGTCAAATGCCGGAGTTGGTGGAACTGGTCATATTTATATTGCACAGCCACCTTTG	240
GB1	TATAAGCTCAAAAAGGTAAGCAAGAGCAATATATATAAGATAACGACGCATTAGAAACT	300
GB2	TATAAGCTCAAAAAGGTAAGCAAGAGCAATATATATAAGATAACGACGCATTAGAAACT	300
CU468230.2	TATAAGCTCAAAAAGGTAAGCAAGAGCAATATATATAAGATAACGACGCATTAGAAACT	300
GB1	TACTTGATTTCAAATGCGATTGATGAGCTTGCTTTATATATTAGTGCTGATGCCGCTGCA	360
GB2	TACTTGATTTCAAATGCGATTGATGAGCTTGCTTTATATATTAGTGCTGATGCCGCTGCA	360
CU468230.2	TACTTGATTTCAAATGCGATTGATGAGCTTGCTTTATATATTAGTGCTGATGCCGCTGCA	360
GB1	ATTACAGGTGAAGCGCTGGCAAAAGTAATTCAAGACTATCAAGTTTCACAAAAGAGCTTA	420
GB2	ATTACAGGTGAAGCGCTGGCAAAAGTAATTCAAGACTATCAAGTTTCACAAAAGAGCTTA	420
CU468230.2	ATTACAGGTGAAGCGCTGGCAAAAGTAATTCAAGACTATCAAGTTTCACAAAAGAGCTTA	420
GB1	CAACGCTTAACGTTACGTTATCCAGCAAGCTTACTTGATGCATTACTCGAAGTCGACGCA	480
GB2	CAACGCTTAACGTTACGTTATCCAGCAAGCTTACTGGATGCATTACTCGAAGTCGACGCA	480
CU468230.2	CAACGCTTAACGTTACGTTATCCAGCAAGCTTACTGGATGCATTACTCGAAGTCGACGCA	480
GB1	TTTAAAGCAGATCAAACCATGATCAAGCTTATGTACAACAATGGGCGGATCAAGTACGT	540
GB2	TTTAAAGCAGATCAAACCATGATCAAGCTTATGTACAACAATGGGCGGATCAAGTACGT	540
CU468230.2	TTTAAAGCAGATCAAACCATGATCAAGCTTATGTACAACAATGGGCGGATCAAGTACGT	540
GB1	GAACTGTACAAGACTACAGCCAAGTTTGGCCCTGAAATACGCTTGAACATTGAA	600
GB2	GAACTGTACAAGACTACAGCCAAGTTTGGCCCTGAAATACGCTTGAACATTGAA	600
CU468230.2	GAACTGTACAAGACTACAGCCAAGTTTGGCCCTGAAATACGCTTGAACATTGAA	600
GB1	CGCGAGAATGCTCAAGGCGAGAAATCTGGCCATTACTGGCCACGTTGTAAGTGT	653
GB2	CGCGAGAATGCTCAAGGCGAGAAATCTGGCCATTACTGGCCACGTTGTAAGTGT	653
CU468230.2	CGTGAAGAATGCTCAAGGCGAGAAATCTGGCCATTACTGGCCACGTTGTAAGTGT	653

Şekil 5. gyrB DNA dizilimi karşılaştırılması

Park ve ark. 56 adet farklı *A. baumannii* izolatında parC (S80L, S80W, S84K), gyrA (S83L) ve gyrB (E479D, D644Y, A677V) mutasyonlarını araştırmıştır. Çalışmada bulunan gyrA (S83L) mutasyonu bizim çalışmamızla uyumludur [9].

Marich Amilia Rizka ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmada 7 *A. baumannii* klinik izolatı üzerinde gyrB mutasyonu araştırılmıştır. Sonuçlarına göre 7 izolattan 5 tanesinde tek nokta mutasyonuna rastlanmış ve gyrB geninde meydana gelen mutasyon nedeniyle siprofiloksasine dirençli olduğu sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda ise gyrB gen bölgesinde mutasyona rastlanmamıştır [19].

Cheng-Hsun Chiu ve ark. çalışmalarına 35 adet *A. baumannii* izolatı dahil etmiştir. parC ve gyrA gen mutasyonlarının dışa atım pompası gen ekspresyonuyla (AdeB) ilişkisi incelenmiş olup parC (S80L, L59G) ve gyrA (S83L) mutasyonları belirlenmiştir. Mutasyonlu gene sahip kültürlerde siprofloksasin direnci gözlemlenmiştir. Meydana gelen mutasyonların siprofiloksasine direnç gelişimine katkı sağladığı sonucuna ulaşılmıştır. İzolatların tamamında parC (S80L) mutasyonu saptanmıştır. 13 adet dirençli izolatın, 9 tanesinde parC (L59G) mutasyonu ve 11 tanesinde gyrA (S83L) mutasyonu saptanmıştır. parC (S80L) mutasyonu sonucunda, *A. baumannii* direncinin geliştiği belirlenmiştir. Çalışmamızdaki gyrA (S83L) mutasyonu ile sonuçlar uyuşmakta fakat parC mutasyon sonucu ile uyuşmamaktadır [20].

Ahmed Hamouda ve ark. tarafından yapılan çalışmada İskoçya'da bulunan 5 hastaneden 9 adet *A. baumannii* dirençli izolatta parC ve gyrA gen mutasyonlarının siprofloksasin direncine sebep olup olmadığı araştırılmıştır. 9 adet dirençli izolatın tamamında gyrA geninde mutasyon tespit edilmiş fakat yalnızca 2 örnekte parC geninde mutasyon saptanmıştır. Yani İki kültürde iki gen bölgesinde de mutasyon saptanmıştır. Her iki gen bölgesinde mutasyon saptanan izolatların aynı zamanda MİK

değerleri de yüksek bulunmuştur. Bu sebeple gyrA ve parC'de meydana gelen mutasyonların siprofloksasin direncine sebep olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu çalışmadaki sonuçlara göre, bizim çalışmamızda sadece gyrA geninde meydana gelen mutasyon sonucu ile uyumludur [21].

2005 yılında Jeom Kyu Lee ve ark., Kore'de farklı hastanelerden toplanan 59 adet *A. baumannii* izolatı üzerinde çalışmıştır. Siprofloksasin direnci ile gyrA-parC genlerinin mutasyonları arasındaki ilişkiyi araştırılmıştır. gyrA genindeki (S83L) mutasyonu ve parC geninde S80L mutasyonu siprofloksasin direnci ile ilişkilendirilmiştir. Bizim çalışmamızda gyrA (S83L) mutasyonu ile örtüşmektedir fakat parC mutasyonu ile örtüşmemektedir [22].

Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak yapılan çalışmalarda yalnızca gyrA (S83L) gen bölgesinde meydana gelen mutasyon ile elde ettiğimiz sonuçlar örtüşmektedir.

Çalışmamızda 73 *A. baumannii* dirençli klinik izolatı kullanıldı. Bu kültürlerle DNA izolasyonu yapıldı ve Real Time PCR uygulanarak gyrA, gyrB ve parC mutasyonu HRM analizi vasıtasıyla gruplara ayrıldı. Ayrılan gruplardan her bir gen bölgesi için iki adet örnek alındı. Sekans analizi uygulandı ve sonucunda bütün izolatlarda gyrA (S83L) gen bölgesinde mutasyon saptandı fakat gyrB ve parC gen bölgelerinde mutasyona rastlanmadı. Bu sebeple elde edilen bulgular doğrultusunda belirlediğimiz hipotezin doğru olduğu sonucuna ulaşılabilir. Bu sonuçlar doğrultusunda çalışmamızda, siprofloksasin direnci gyrA (S83L) gen bölgesinde meydana gelen mutasyon ile ilişkilendirilmiştir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: U.K., T.S., S.Ö., F.K.O.; Tasarım: U.K., T.S., S.Ö., F.K.O.; Denetim: T.S., S.Ö., F.K.O.; Kaynaklar: U.K., T.S., S.Ö., F.K.O.; Malzemeler: T.S., S.Ö., F.K.O.; Veri Toplama ve/veya İşleme: U.K., T.S., S.Ö., F.K.O.; Analiz ve/veya Yorumlama: T.S., S.Ö., F.K.O.; Literatür Taraması: U.K.; Makalenin Yazılması: U.K.; Kritik İnceleme: S.Ö., T.S., F.K.O.; Diğer: U.K., T.S., S.Ö., F.K.O.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

ETİK KURUL ONAYI

Çalışmamız için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 22.10.2014 tarihinde onay alınmıştır. Karar no: 19/06

KAYNAKLAR

1. Kayış, A. (2018). Doktora Tezi. KSÜ araştırma ve uygulama hastanesi'nde hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Acinetobacter baumannii* izolatlarının hızlı moleküler epidemiyolojik tanısı. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş, Türkiye.
2. Tünay, A. (2012). Tıpta Uzmanlık Tezi. Hastane kaynaklı pan drug resistant *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarında risk faktörlerinin araştırılması. Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyonkarahisar, Türkiye.
3. Şahin, A.R., Doğruer, D., Nazik, S., Aktemur, A., Öksüz, H., Aral, M., Ateş, S. (2019). Hastane kökenli patojenlerde artan antimikrobiyal direnç sorunu: *Acinetobacter baumannii*. Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi, 4(2), 156-169. [CrossRef]
4. Azap, Ö.K., Timurkaynak, F., Arslan, H., Karaman, S.Ö. (2004). Hastane enfeksiyon etkeni olarak izole edilen non-fermentatif gram negatif bakterilerde siprofloksasin, ofloksasin ve levofloksasinin *in-vitro* etkinliğinin karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 57(4), 189-194. [CrossRef]
5. Uğur, M., Genç, S. (2019). Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının üç yıllık direnç profili. Turkish Journal of Intensive Care, 17(3), 130-137. [CrossRef]
6. Serapide, F., Guastalegname, M., Gulli, S.P., Lionello, R., Bruni, A., Garofalo, E., Longhini, F., Treçarichi, E.M., Russo, A. (2024). Antibiotic treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in view of the newly developed β -Lactams: A narrative review of the existing evidence. Antibiotics, 13, 1-16. [CrossRef]

7. Özgür, Ö., Aksaray, N. (2014). Acinetobacter infections and treatment. *Journal of Pediatric Infection*, 8(1), 28-32. [\[CrossRef\]](#)
8. Abdallah, D.N.A. (2024). Yüksek Lisans Tezi. Kinolon dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında plazmit aracılı kinolon direnç genlerinin araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir, Türkiye.
9. Park, S., Lee, K.M., Yoo, Y.S., Yoo, J.S., Yoo, J.I., Kim H.S., Lee, Y.S., Chung, G.T. (2011). Alterations of gyrA, gyrB, and parC and activity of efflux pump in fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 2(3), 164-170. [\[CrossRef\]](#)
10. Liu, Y.H., Kuo, S.C., Lee, Y.T., Chang, I.C.Y., Yang, S.P., Chen, T.L., Fung, C.P. (2012). Amino acid substitutions of quinolone resistance determining regions in gyrA and parC associated with quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 45, 108-112. [\[CrossRef\]](#)
11. Giles, J., Hardick, J., Yuenger, J., Dan, M., Reich, K., Zenilman, J. (2004). Use of applied biosystems 7900HT sequence detection system and taqman assay for detection of quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3281-3283. [\[CrossRef\]](#)
12. Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., Madden, T.L. (2008). NCBI BLAST: A better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36, 5-9. [\[CrossRef\]](#)
13. Ye, J., McGinnis, S., Madden, T.L. (2006). BLAST: Improvements for better sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, 34, 6-9. [\[CrossRef\]](#)
14. Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948. [\[CrossRef\]](#)
15. Sheng, W.H., Lin, Y.C., Wang, J.T., Chen, Y.C., Chang, S.C., Hsia, K.C., Wu, R.J., Li, S.Y. (2009). Identification of distinct ciprofloxacin susceptibility in *Acinetobacter* spp. by detection of the gyrA gene mutation using real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 23(3-4), 154-156. [\[CrossRef\]](#)
16. Shahhat, M.S.A., Gaballa, E.A.E.Y., Rohman, R.Z.A.E., Mohamme, M.N., Yassin, A.S. (2021). Association between mutations in GyrA/B and ParC/E genes of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and fluoroquinolones resistance. *Microbes and Infectious Diseases*, 2 (2), 343-351. [\[CrossRef\]](#)
17. Hong, C.K., Kim, J., Kim, G.Y. (2021). Characteristics of quinolone resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from general hospitals. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 14(3), e115128. [\[CrossRef\]](#)
18. Tantawy, E.A., Sayed, H.M.E., Matar, H.M., Azhary, B.A.E. (2020). Multi and extensive drug resistant *Acinetobacter baumannii* in ICUs: Risk factors, antimicrobial resistance profiles and cohabiting of gyrA and parC mutations. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 29(4), 109-116.
19. Rizka, M.A., Hasmono, D., Kuntaman. (2014). The profile of genetic mutation of the gyrB gene on clinical isolation of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. *Folia Medica Indonesiana*, 50(4), 215-218.
20. Chiu, C.H., Lee, H.Y., Tseng, L.Y., Chen, C.L., Chia, J.H., Su, L.H., Liu, S.Y. (2010). Mechanisms of resistance to ciprofloxacin, ampicillin/sulbactam and imipenem in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Taiwan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, 382-386. [\[CrossRef\]](#)
21. Hamouda, A., Amyes, S.G.B. (2004). Novel gyrA and parC point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(3), 695-696. [\[CrossRef\]](#)
22. Lee, J.K., Lee, Y.S., Park, Y.K., Kim, B.S. (2005). Mutations in the gyrA and parC genes in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Microbiology and Immunology*, 49(7), 647-653. [\[CrossRef\]](#)



ECZANE VE AKTARLARDA SATILAN BAZI SUSAM YAĞI ÖRNEKLERİ ÜZERİNDE KALİTE KONTROL ÇALIŞMALARI

QUALITY CONTROL STUDIES ON SOME SESAME OIL SAMPLES SOLD IN PHARMACIES AND HERBALISTS

Halilibrahim Aykut ŞAHİN¹ , Gülen İrem KAYA^{1*} 

¹Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 35040, İzmir, Türkiye

ÖZ

Amaç: Sabit yağlar; doğal kaynaklardan elde edilen ve vücutta dahilen ve haricen çeşitli fizyolojik etkilere sebep olan karışımlardır. Sabit yağlar elde edildiği bitkiye bağlı olarak serbest yağ asitleri, bunların gliserol esterlerini, aromatik bileşikler, fenolik bileşikler, fitosteroller ve vitaminler gibi bileşenleri içerirler. Piyasada satılan sabit yağların kaynağına ve kalitesine dair doğru bilgiye ulaşmak her zaman mümkün olmamaktadır. Fitoterapide terapötik ajan olarak ve aromaterapide taşıyıcı yağ olarak, farmakope kalitesinde olan sabit yağlar tercih edilmelidir. Sabit yağlardan biri olan susam yağı fitoterapide dahilen kabızlık, özellikle de diskezi tedavisinde kullanılırken, haricen romatizmal ağrılarda masaj yağı olarak ve cilt kuruluşuna bağlı rahatsızlıklarda yumuşatıcı olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmamızda etkileri ve fitoterapide kullanımlarından yola çıkılarak, eczane ve aktarlarda satılan bazı susam yağı örneklerinin Türk Farmakopesi 2017'ye uygunluğunun değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada eczane ve aktarlarda satılan 6 farklı ticari susam yağ örneği üzerinde Türk Farmakopesi 2017'de susam yağı için belirtilen; genel özelliklerden, asit değeri, peroksit sayısı, % sabunlaşmayan madde miktarı, bağıl yoğunluk ve kırılım imleci tayinleri yapılmıştır. Çalışmamızda ayrıca yağın içindeki alkali safsızlıklar ve yabancı yağ olarak pamuk tohumu yağı arama testleri yürütülmüştür. Bunun yanında susam yağı örnekleri ile farklı yağ örnekleri ince tabaka kromatografisi (İTK) yöntemiyle karşılaştırılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Piyasadan temin edilen numunelerle yapılan farmakope analizleri sonucunda elde edilen veriler ışığında; analizi yapılan susam yağı örneklerinden 2 tanesinin farmakope belirtilen bütün kalite değerlerine uyduğu görülmektedir. Hiçbir yağ örneğinde alkali safsızlık ve pamuk tohumu yağı tespit edilmemiştir. İTK ile yapılan çalışmada bir susam yağı örneğinin farklı bir yağ ile karıştırılmış olabileceği sonucuna varılmıştır. Örnek olarak temin edilip çalışılan susam yağlarının yapılan farmakope analizleri sonuçları, piyasadaki pek çok susam yağının farmakope kalitesinde olmadığını ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Farmakope analizi, fitoterapi, sabit yağ, Türk Farmakopesi

ABSTRACT

Objective: "Fixed oils; are mixtures obtained from natural sources and cause various physiological effects internally and externally in the body. Depending on the plant from which they are obtained, fixed oils contain substances such as free fatty acids, their glycerol esters, aromatic compounds,

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Gülen İrem KAYA
e-posta / e-mail: gulen.irem.kaya@ege.edu.tr, Tel. / Phone: +902323114079

phenolic compounds, phytosterols, and vitamins. It is not always possible to obtain accurate information about the source and quality of fixed oils sold in the market. Fixed oils of pharmacopoeial quality should be preferred as therapeutic agents in phytotherapy and as carrier oils in aromatherapy. Sesame oil, one of these fixed oils, is used internally in phytotherapy to treat constipation, especially dyschezia, while externally it is used as a massage oil in rheumatic pain and as an emollient in dry skin diseases. Due to these activities and its use in phytotherapy; it is aimed to evaluate the compliance of some sesame oil samples sold in pharmacies and herbalists with the Turkish Pharmacopoeia 2017.

Material and Method: *In this study, on 6 different commercial sesame oil samples sold in pharmacies and herbalists, acidity, peroxide number, unsaponifiable substance values, relative density and refractive index determinations were made. Alkaline impurities and cottonseed oil search tests as foreign oil were also carried out which are amongst the Turkish Pharmacopoeia 2017 monograph on sesame oil in our study. In addition, sesame oil samples were compared with different oil samples using the Thin Layer Chromatography (TLC) method*

Result and Discussion: *According to the data obtained as a result of pharmacopoeia analyzes carried out on samples; It was recorded that 2 of the analyzed sesame oil samples comply with all quality values specified in the pharmacopoeia. No alkaline impurities and cottonseed oil were detected in any oil samples. In the study, conducted using TLC, it was concluded that one oil sample may have been adulterated with a different oil. As an example, the results of the pharmacopoeial analysis of the sesame oils have revealed that many sesame oils available in the market are not of pharmacopoeial quality.*

Keywords: *Fixed oil, pharmacopoeia analysis, phytotherapy, Turkish Pharmacopoeia*

GİRİŞ

Susam (*Sesamum indicum* L.), Pedaliaceae familyasına ait bir bitki olup, dünyada kültürü yapılan en eski ve en önemli yağ bitkilerindendir. Yağ içeriği bakımından zengin tohumlarının üretimi için yetiştirilir. Susam koşullara bağlı olarak yaklaşık 0.5 ila 2.5 m boyunda büyür [1]. Çok çiçekli bir bitki olup, meyvesi bir dizi küçük yağlı tohum içeren bir kapsüldür. Susam tohumları çok küçüktür ve 4 mm uzunluğunda 2 mm genişliğinde ve 1 mm kalınlığındadır. İnci şeklinde, oval, küçük, hafifçe düzleştirilmiş ve hilumda biraz daha incedir. İlkbaharda ekilen tohumlarla çoğaltılır ve tohumların tamamen olgunlaşması yaklaşık dört ay sürer [2]. Tohumlar, krem-beyaz ile kömür-siyah arasında çeşitli renklerde olabilir. Susam tohumunun yağ içeriği susamın çeşidine göre % 28 ile % 59 arasında değişebilir [3]. Susam tohumları yaklaşık % 20 protein içerir. Susam yağı gama tokoferol içeriği bakımından zengindir [4]. Yağda eriyebilen en güçlü doğal antioksidanlar olan tokoferoller, hem yağın vitamin E olarak besleme değerini hem de yağın içerdiği lignan yapılı bileşiklerden sesamin ve sesamolün gibi antioksidan değerini artırmaktadır [5]. Susam yağı; % 35.9-42.3 oleik asit, % 41.5-47.9 linoleik asit, % 7.9-10.2 palmitik asit, % 4.8-6.1 stearik asit, % 0.3-0.4 linolenik asit ve % 0.3-0.6 araşidik asit yağ asitlerini içerir [6]. Ayrıca susam yağı kalsiyum, magnezyum, fosfor, potasyum, demir, sodyum, karoten, niasin, vitamin B1 ve vitamin B2 içerir [7]. Yağlı tohumlardan geleneksel olarak yağ elde edilmesinde, soğuk pres veya çözücü ekstraksiyonu yöntemleri kullanılır. Ekstraksiyon yönteminin amacı, yağ kalitesinin korunması ile yağ verimini optimize etmektir. Ekstraksiyondan önce bazı ön işlemler uygulanır. Çözücü ekstraksiyonu preslemeden daha avantajlı gibi görünse de tüketici daha sağlıklı olduğu için son dönemlerde işlenmemiş yani soğuk pres yöntemiyle elde edilmiş yağları daha çok talep etmektedir [8].

Dünya susam yağı üretimi için yapılan sıralamada ilk sırayı Çin ve Myanmar paylaşmaktadır. Bunları izleyen Tanzania, Hindistan, Sudan, Japonya ve Mozambik'ten sonra, Türkiye susam yağı üretiminde dünyada 8. sırada yer almaktadır [9]. Susam tarımının gelişmesini engelleyen en önemli faktör düşük tohum verimidir. Dünyada 6.5 milyon gibi geniş bir alanda susam üretilmekle birlikte, tohum veriminin düşük olması nedeniyle (ortalama 48.1 kg/da) üretim 3.2 milyon ton gibi düşük bir seviyede kalmaktadır. Özellikle, makinalı hasada uygun ve kapsüllerini çatlatmayan (indehiscens tipi) yüksek verimli çeşitlerin yetersiz ve mevcutların adaptasyon alanlarının dar oluşu susam tarımının dünyada istenilen düzeyde gelişmesini engellemektedir. Bu nedenle de susam tarımı dünyada daha çok el emeğinin ucuz ve işgücünün fazla olduğu ülkelerde yapılmaktadır [10]. Ekonomik olarak büyük önemi olan susam yağı, yemeklik olarak kullanıldığı gibi Türkiye de dahil birçok ülkede fonksiyonel

gıda olarak da kullanılmaktadır. Lipofilik ilaç etken maddeleri oral yoldan alınmıyorsa yağlı çözelti haline enjektabl formda sunulur. Hangi yağların kullanılacağı yağların termik rezistan özelliğine bağlıdır. Çünkü parenteral olarak kullanılacak yağlar sıcak hava sterilizasyonuna tabi tutulmaktadır. Yer fıstığı yağı, zeytinyağı, hint tohumu yağı ve susam yağı bu özelliklere sahip olduğundan kullanılırlar. Bu kullanımlarıyla ilgili en somut belirteç asit değeridir. Susam yağının bu nedenle eczacılıkta enjektabl preparatların üretiminde kullanımı bulunmaktadır. Özellikle de seksüel hormonların intramüsküler aplikasyon olarak uygulanmasında tercih edilir. Ayrıca göz damlası, krem, pomatlar yapımında kullanımı mevcuttur [11].

Uzun yıllardan beri, Çin ve Japonya’da susam tohumu içeren yiyeceklerin düzenli bir şekilde yenilmesinin, yaşlanma karşıtı etkisi olduğuna inanılır ve bu nedenle yoğun olarak tüketilir. Son yıllarda bu etki, (SAM kullanılması ile) yaşlanma hızlandırılmış hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, susam tohumunda lipid peroksidasyonu gibi yaşlanmaya neden olan faktörlerin birikmesini önleyen bileşenler bulunduğu bilgisi ile desteklenmiştir [12,13]. Fitoterapide, aromaterapide ve kozmetik sanayinde de susam yağının çeşitli kullanım alanları vardır. Susam yağının halk arasında dahilen kabızlık, özellikle de diskezi tedavisinde kullanımı mevcutken haricen romatizmal ağrılarda masaj olarak ve cilt kuruluğuna bağlı rahatsızlıklarda yumuşatıcı olarak kullanılmaktadır [14]. Antiaterosklerotik, antihiperlipidemik, antidiyabetik, antibakteriyel etkileri çeşitli bilimsel çalışmalar ile gösterilmiştir [15-18]. Son yıllarda antikanser, antienflamatuvar, östrojenik ve bilişsel aktivite ile Alzheimer hastalığının önlenmesi üzerine etkileri de ortaya konmuştur [19-23]. Bu etkilere bağlı artan talebe karşı Türkiye’de eczanelerde, aktar ve marketlerde satışa sunulan susam yağı üretici firma sayıları sürekli artmaktadır.

Susam yağının taşınması gereken nitelikler Türk Farmakopesi 2017’de “Rafine Susam Yağı Monografi”nda ve Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı ile Anılan Yemelik Yağlar Tebliğinde ve Kodeks Alimentarius’da “Soğuk preslenmiş ve natürel yağlar” bölümünde yer almaktadır. Kalite kontrollerinde bu farklı kaynaklardaki temel kriterler birbirine benzemektedir. Türkiye’de kullanımı ve satışı bu kadar artmasına rağmen piyasadaki susam yağlarının kalite kontrolleri yapılmamaktadır. Sağlık alanında kullanılan her ürün gibi susam yağının da kalitesi faydalı bir sağlık ürünü olarak kullanılabilmesi açısından önemlidir.

Araştırmamızdaki amacımız eczane ve aktarlarda satılan susam yağlarının kalite kontrollerini yapmak ve gereken nitelikleri taşıyıp taşımadıklarını incelemektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Tablo 1’de kodları belirtilmiş İzmir ilinde eczanelerden ve aktarlardan temin edilen 6 farklı markaya ait natürel ve soğuk sıkım susam yağı örneği üzerinde kalite kontrol çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışılan tüm ticari susam yağı örneklerinin ve standart olarak kullanılan diğer tüm yağ örneklerinin üzerinde T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı İşletme Kayıt Numarası yer almaktadır. Kalite kontrol çalışmaları Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Denemeler üç paralel olarak yürütülmüştür. Reaktiflerin hazırlanmasında analitik saflıkta kimyasallar, 0.25 mm kalınlıkta silikajel 60 HF254 (Merck Art 5715) hazır kromatografi plağı ve distile su kullanılmıştır.

Tablo 1. Araştırma kapsamında incelenen eczane ve aktardan temin edilen örneklerin kodları

Örnek İsmi	Kodu
Eczane Sesami Oleum Örneği 1	ES1
Eczane Sesami Oleum Örneği 2	ES2
Eczane Sesami Oleum Örneği 3	ES3
Aktar Sesami Oleum Örneği 1	AS1
Aktar Sesami Oleum Örneği 2	AS2
Aktar Sesami Oleum Örneği 3	AS3

Susam yağı örneklerinin Türk Farmakopesi 2017’ye göre asit değeri, peroksit değeri ve sabunlaşmayan madde (%) miktarı, bağlı yoğunluk ve kırılım imleci değerleri tespit edilmiştir.

Çalışmamızda ayrıca Türk Farmakopesi 2017’de yer alan yağın içindeki alkali safsızlık ve yabancı yağ olarak pamuk tohumu yağı arama testleri yapılmıştır [24]. Bunun yanında susam yağı örnekleri İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) yöntemiyle farklı yağ örnekleri ile karşılaştırılarak incelenmiştir (Şekil 1) [25].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Eczane ve aktardan temin edilen 6 yağ örneği üzerinde yapılan kalite kontrolü tayinlerinin sonucu Tablo 2’de yer almaktadır.

Tablo 2. İncelenen susam yağı örneklerinin bazı kalite özellikleri

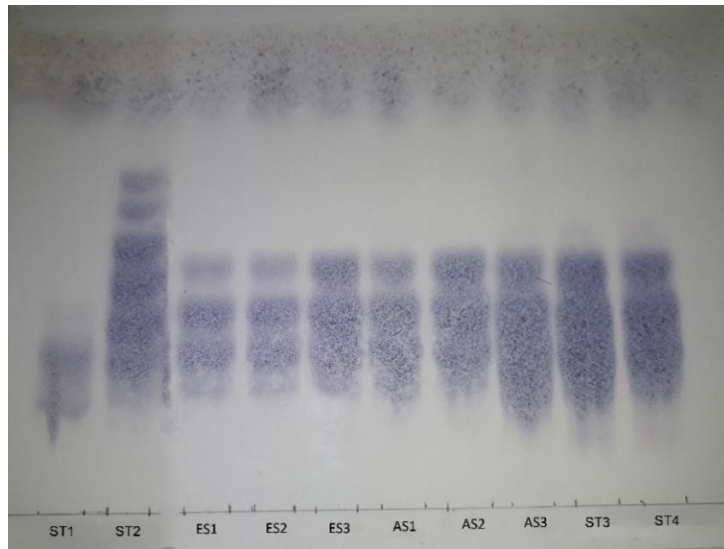
Örnek Kodu	Asit değeri (mg KOH g ⁻¹) ortalama değer ± standart sapma	Peroksit değeri (mEq O ₂ kg ⁻¹) ortalama değer ± standart sapma	Sabunlaşmayan madde miktarı (%)	Bağlı yoğunluk	Kırılma imleci (20 ± 0.5°C)
ES1	2.5908 ± 0.030	3.5447 ± 0.069	1.7680	0.920	1.472
ES2	31.3165 ± 1.084	5.9875 ± 0.024	3.1873	0.919	1.473
ES3	3.2513 ± 0.040	17.8444 ± 0.138	1.3006	0.922	1.472
AS1	15.8696 ± 1.110	4.1332 ± 0.054	15.8576	0.917	1.475
AS2	1.1274 ± 0.745	9.4569 ± 0.074	0.7293	0.913	1.473
AS3	5.0136 ± 0.024	6.5802 ± 0.090	6.0664	0.913	1.475

ES1, ES2 ve ES3 eczaneden temin edilen susam yağı örnekleri, AS1, AS2 ve AS3 aktardan temin edilen susam yağı örnekleridir

Eczane ve aktardan temin edilen 6 yağ örneğinin; asit değerinin 1.1274-31.3165 mg KOH g⁻¹; peroksit değerinin 3.5447- 17.8444 mEq O₂ kg⁻¹; sabunlaşmayan madde miktarının % 0.7293-15.8576; bağli yoğunluğunun 0.913-0.922 ve kırılma imlecinin 1.472-1.475 arasında olduğu bulunmuştur.

Türk Farmakopesi 2017’de yer alan susam yağında alkali safsızlık testi ve yabancı yağ olarak pamuk tohumu yağı arama çalışması tüm yağ örneklerine uygulanmıştır. Hiçbir yağ örneğimizde alkali safsızlık ve pamuk tohumu yağı tespit edilmemiştir (Tablo 3).

Eczane ve aktardan temin edilen 6 yağ örneği üzerinde İTK yöntemi ile karşılaştırma yapılmıştır [25]. Sonuç olarak elde ettiğimiz kromatogram (Şekil 1)’de yer almaktadır. Burada örnekler zeytinyağı, badem yağı, mısırözü yağı, yer fıstığı yağı gibi farklı bazı yağ örnekleri ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 1. Yağların İTK ile teşhisi (ST1: Zeytinyağı; ST2: Badem yağı; ST3: Mısırözü yağı; ST4: Yer fıstığı yağı; ES1, ES2 ve ES3 eczaneden temin edilen susam yağı örnekleri, AS1, AS2 ve AS3 aktardan temin edilen susam yağı örnekleridir)

Tablo 3. İncelenen susam yağı örneklerinin Türk Farmakopesi ve Kodeks Alimentarius'a göre analiz sonuçlarının uygunluklarının değerlendirilmesi (+) uygundur; (-) uygun değildir

Örnek Kodu	Asit değeri (Kodeks Alimentarius'a göre)	Peroksit değeri (mEq O ₂ kg ⁻¹) (TF 2017'e göre)	Sabunlaşmayan madde değeri (%) (TF 2017'e göre)	Bağlı yoğunluk (TF 2017'e göre)	Kırılım imleci (20±0.5°C) (TF 2017'e göre)	Alkali safsızlık ve pamuk tohumu yağı aranması (TF 2017'e göre)
ES1	+	+	+	+	+	Tespit edilmedi
ES2	-	+	-	+	+	Tespit edilmedi
ES3	+	-	+	+	+	Tespit edilmedi
AS1	-	+	-	+	+	Tespit edilmedi
AS2	+	+	+	+	+	Tespit edilmedi
AS3	-	+	-	+	+	Tespit edilmedi

Asit değeri, yağlarda bulunan serbest yağ asidi miktarını ifade etmek için kullanılır. Normal şartlarda, yağ asitleri trigliserit formunda bulunur, ancak işleme sırasında yağ asitleri serbest yağ asidine hidrolize edilebilir. Asit değeri ne kadar yüksek olursa, yağ kalitesinin düşmesine neden olan serbest yağ asidi seviyesi o kadar yüksek olur [26]. Türk Farmakopesi'nde monograf olarak sadece "rafine susam yağı" yer almaktadır. Rafinasyon işlemi yağ içeriğinde fazla olan serbest yağ asitlerinin ve diğer istenmeyen bileşiklerin uzaklaştırılması ile yağın arıtılması işlemidir. Rafine edilmiş susam yağı için Türk Farmakopesi'nde belirtilen asit değeri 0.5 mg KOH g⁻¹ dir. Çalıştığımız yağ örnekleri için asit değerleri 1.1274 ile 31.3165 mg KOH g⁻¹ arasındadır. Bizim örneklerimiz rafinasyon işlemi görmemiş soğuk preslenmiş naturel susam yağlarıdır. Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı ile Anılan Yemelik Yağlar Tebliğine göre soğuk preslenmiş ve natürel yağlarda asitlik değeri en çok 4.0 mg KOH g⁻¹ yağ olarak belirlenmiştir [6]. Yine Kodeks Alimentarius'a göre de soğuk preslenmiş ve natürel yağlarda en fazla 4.0 mg KOH g⁻¹ yağ olarak belirtilmektedir [27]. İncelenen ES1, ES3 ve AS2 yağ örnekleri Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı ile Anılan Yemelik Yağlar Tebliğine ve Kodeks Alimentarius'a göre uygun asit değerlerine sahipken AS3, AS1 ve ES2 yağ örneklerinin asit değerleri yüksektir. Farklı ülkelerde yapılan ham susam yağlarının asit değerlerinin ölçüldüğü çalışmalarda 1.640 mg KOH g⁻¹ [28] ve 4.196 mg KOH g⁻¹ [29] gibi farklı değerler ölçülmüştür.

Peroksit değeri, bir oksidasyon veya bozulma ölçüsüdür. Peroksit değeri, ılımlı koşullar altında meydana gelen ransiditenin erken aşamalarının yararlı bir göstergesidir. Peroksit değeri Türk Farmakopesi'nde rafine susam yağı için en fazla 10 olması gerektiği belirtilmekte olup parenteral preparatların üretiminde kullanılacak ise en fazla 5 olması gerektiği belirtilmektedir [24]. Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı ile Anılan Yemelik Yağlar Tebliğine göre soğuk preslenmiş ve natürel yağlarda en çok 15 mEq O₂ kg⁻¹ yağ olarak belirlenmiştir [6]. Kodeks Alimentarius'a göre rafine yağlar için en fazla 10 mEq O₂ kg⁻¹ yağ olarak belirtilmiştir. Soğuk preslenmiş ve natürel yağlarda en fazla 15 mEq O₂ kg⁻¹ yağ olarak belirtilmektedir [27]. ES3 yağ örneği hariç diğer tüm yağ örneklerinin Türk Farmakopesi 2017'de belirtilen peroksit değerine uygun olduğu görülmektedir. Türkiye'de elde edilen susam tohumu yağlarının fiziksel ve kimyasal özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada susam yağlarının peroksit değerlerinin 1.93 ile 2.99 mEq O₂ kg⁻¹ arasında olduğu bildirilmiştir [30].

Sabunlaşmayan madde, yağda çözünmüş halde bulunan fakat alkalilerle sabunlaşmayan maddelerin toplamıdır. Bunlar yüksek alifatik alkoller, fitosteroller, pigmentler, hidrokarbonlar gibi maddelerdir. Sabunlaşmayan madde susam yağı için Türk Farmakopesi'nde en fazla % 2.0 olması gerektiği belirtilmektedir [24]. Benzer şekilde Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı ile Anılan Yemelik Yağlar Tebliği'ne göre susam yağında sabunlaşmayan madde değeri 20 g/kg (% 2.0) altında olması gerektiği belirtilmiştir [6]. Çalıştığımız yağ örneklerinin için sabunlaşmayan madde değerleri 0.7293 ile 15.8576 arasında olduğu saptanmıştır. ES1, ES3 ve AS2 yağ örnekleri Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı ile Anılan Yemelik Yağlar Tebliğine ve Kodeks Alimentarius'a göre uygun % sabunlaşmayan madde miktarına sahipken AS3, AS1 ve ES2 yağ örneklerinin yüksek olduğu görülmektedir. Türkiye'de elde edilen susam tohumu yağlarının fiziksel ve kimyasal özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada susam yağlarının

sabunlaşmayan madde değerleri % 1.04 ile % 1.75 arasında bulunmuştur [30]. Mineral yağlarla tağşişat sabunlaşmayan madde miktarını yükseltir. Normal değer %1-2 arasındadır [11].

Bağıl yoğunluk belirli sıcaklıkta belirli hacimdeki yağ ağırlığının aynı sıcaklık ve hacimdeki suyun ağırlığına oranının tespitidir. Türk Farmakopesi'ne göre rafine susam yağının bağıl yoğunluğu yaklaşık 0.919 olarak belirtilirken [24], Kodeks Alimentarius'da susam yağı için bağıl yoğunluk değeri için 0.919-0.925 aralığı [27] bildirilmektedir. Çalıştığımız yağ örnekleri için relatif yoğunluk değerleri 0.913 ile 0.922 arasındadır. Genel olarak incelenen susam yağlarının bağıl yoğunluklarının uygun olduğu görülmektedir. Türkiye'de elde edilen susam tohumu yağlarının fiziksel ve kimyasal özelliklerinin araştırıldığı farklı bir çalışmada susam yağlarının relatif yoğunluk değerleri 0.9175 ile 0.9214 arasında bulunmuştur [30].

Kırılım imleci yağın tanımlanan bir dalga boyunda ışığın boşluktaki hızının yağdaki hızına oranıdır. Kırılım imleci, dalga boyu, sıcaklık, doymamışlık derecesi, yağ asidi ve yağ asidi bileşenleri ile değişir. Kırılım imleci, kalite kontrolün değerlendirilmesinde, malzemelerin saflığını kontrol etmede, hidrojenasyon ve izomerleştirmeyi takip etmede yaygın olarak kullanılmaktadır [26]. Kırılım imleci, Türk Farmakopesi'nde rafine susam yağı için yaklaşık 1.473 olarak belirtilirken [24]. Kodeks Alimentarius'da susam yağı için refraksiyon indisi değeri 25°C'de 1.465-1.469 arasında olması gerektiği bildirilmektedir [27]. Çalıştığımız yağ örnekleri için kırılım imleci değerleri 1.472 ile 1.475 arasındadır. Tüm yağ örneklerimizin refraksiyon indisi değerleri Türk Farmakopesi 2017'de belirtilen değere yakın olduğu görülmektedir. Türkiye'de elde edilen susam tohumu yağlarının fiziksel ve kimyasal özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada susam yağlarının kırılım imleci (refraksiyon indisi) değerlerinin 1.4700 ile 1.4707 arasında bulunmuştur [30].

Türk Farmakopesi 2017'de belirtilen yağ asitlerinin alkali safsızlıklar testine tüm örnekler uygunluk göstermektedir. Hiçbir yağ örneğimizde alkali safsızlık görülmemiştir. Türk Farmakopesi 2017'de belirtilen susam yağında yabancı yağ olarak pamuk tohumu yağı aranması testi de örneklerimizde uygulanmıştır. Hiçbir örneğimizde pamuk tohumu yağı tespit edilememiştir. Susam yağı tağşişatında fiyatının ucuz olmasından dolayı sıkça kullanılan pamuk tohumu yağının hiçbir örneğimizde olmaması oldukça önemlidir. Örneklerimiz üzerinde İTK yöntemi ile karşılaştırma yapılmıştır [25]. Sonuç olarak elde ettiğimiz kromatogram Şekil 1'de yer almaktadır. Burada örnekler zeytinyağı, badem yağı, mısırözü yağı, yer fıstığı yağı gibi farklı bazı yağ örnekleri ile karşılaştırılmıştır. ES1, ES2, ES3, AS1 ve AS2 örneklerinin genel olarak birbirlerine benzediği görülmüştür. Ancak AS3 örneğinin kromatogramı incelediğinde bu susam yağı örneğinin mısır özü yağ ile karıştırılmış olabileceği düşünülmektedir.

Eczanelerde ve aktarlarda satılmakta olan susam yağının kullanımı son zamanlarda giderek artmaktadır. Değerli bir tohum yağı olarak susam yağı gıda sanayinde, eczacılıkta fitoterapide, aromaterapide ve kozmetik alanlarda çok sayıda yararlı özelliğinden dolayı kullanılmaktadır. Çalışmamızda incelenen tüm susam yağı örneklerinin, kırılım imleci ve bağıl yoğunluk değerlerinin monografta belirtilen değerler ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde alkali safsızlık ve yabancı yağ olarak pamuk tohumu yağı aranması analizleri için yapılan çalışmalarda olumsuz bir safsızlık tespit edilememiştir [24]. Susam yağı tağşişatında fiyatının ucuz olmasından dolayı sıkça kullanılan pamuk tohumu yağının hiçbir örneğimizde olmaması oldukça önemlidir. İncelenen 6 adet susam yağı örneğinden ancak biri eczane ve biri de aktardan temin edilen 2 tanesinin Türk Farmakopesi'nde ve Kodeks Alimentarius'da yer alan tüm testlere uygunluk gösterdiği tespit edilmiştir.

Gıda ve sağlık alanında kullanılan bütün ürünler üzerinde kalite kontrol çalışmaları yapılmalıdır. Bu kontrollerden geçen ürünler ancak amacına uygun bir şekilde güvenle kullanılabilir. Burada aktarların sağlık açısından maalesef sorumluluğu daha az ve ürünleri denetimsizdir. Bu konuda değişimi gerçekleştirmek için, özellikle eczacılarımıza önemli bir görev düşmektedir. Eczanede satılan ürünlerin muhakkak güvenilir, kaliteli yani kalite kontrolü yapılmış ürünler olması gereklidir. Bu nedenle depolardan temin ederek, hastalarına sundukları ilaç dışı fonksiyonel gıda olarak kullanımı önerilen bu ürünleri, kalite kontrolü yapan firmalardan almaları gerekmektedir. Firmalar kalite kontrolü olmayan ürünlerin eczanede satılmadığını ve bu kalite kontrollerinin yapılmasının zorunlu olduğunu bilecekler ve bu şekilde kalite kontrolünü üretim prosedürlerine ekleyerek, kaliteli ürünleri piyasaya sunacaklardır. Eczanede satılan üç üründen birinin kalitesinin tüm kriterlere uygun olup, diğerlerinin uymaması, bize eczacıların bu konuda daha duyarlı ve dikkatli olmaları gerektiğinin vurgusunu yapmaktadır.

Çalışmamız eczanede ve aktarlarda satılan bitkisel yağların ve diğer doğal ürünlerin kalite kontrollerinin, yani Türk Farmakopesi'ne ve Yemelik Yağlar Tebliği ve Kodeks Alimentarius gibi bu konularda otorite olan kaynaklarda belirtilen şartlara uygunluklarının araştırılmasına yönelik çalışmaların önemini ve gerekliliğini ortaya koymaktadır. Araştırmamızda tespit ettiğimiz sonuçlar genişletilmesi planlanan Türk Farmakopesi için referans olabilecek nitelikte olup, soğuk pres naturel susam yağı monografi hazırlanmasına da katkı sağlayabilecektir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü tarafından (TYL-2019-20588) desteklenmiştir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: G.İ.K.; Tasarım: H.A.Ş., G.İ.K.; Denetim: G.İ.K.; Kaynaklar: G.İ.K.; Malzemeler: H.A.Ş., G.İ.K.; Veri Toplama ve/veya İşleme: H.A.Ş., G.İ.K.; Analiz ve/veya Yorumlama: H.A.Ş., G.İ.K.; Literatür Taraması: H.A.Ş., G.İ.K.; Makalenin Yazılması: H.A.Ş., G.İ.K.; Kritik İnceleme: G.İ.K.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

ETİK KURUL ONAYI

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

KAYNAKLAR

1. Chakraborty, G.S., Sharma, G., Kaushik, K.N. (2008). *Sesame indicum*: A review. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 2(2), 15-19.
2. Pusadkar, P., Eswaran, K., Bonde, S., Mohite, N. (2015). Sesame (*Sesamum indicum* L.) importance and its high quality seed oil: A review. *Trends in Biosciences*, 8(15), 3900-3906.
3. Hwang, L.S., (2005). Sesame Oil. In: F. Shahidi (Ed.) *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, (pp. 537-574). John Wiley and Sons, New York. [CrossRef]
4. Martinchik, A.N. (2011). Nutritional value of sesame seeds. *Voprosy Pitaniia*, 80(3), 41-43.
5. Pongracz, G., Weiser, H., Matzinger, D. (1995). Tocopherole-antioxidantien der natur. *European Journal of Lipid Science and Technologie*, 97(3), 90-104. [CrossRef]
6. Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı ile Anılan Yemelik Yağlar Tebliği (Tebliğ No: 2012/29), (2001). From <https://www.resmigazete.gov.tr>. Erişim tarihi: 23.08.2020.
7. Namiki, M. (2007). Nutraceutical functions of sesame: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47 (7), 651-673. [CrossRef]
8. Wijesundera, C., Ceccato, C., Fagan, P., Shen, Z. (2008). Seed roasting improves the oxidative stability of canola (*B. napus*) and mustard (*B. juncea*) seed oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(4), 360-367. [CrossRef]
9. Şahin, G. (2014). Türkiye'de üretimi azalan önemli bir yağ bitkisi susam. *Journal of the Human & Social Science Researches*, 3(2),404-433. [CrossRef]
10. Baydar, H. (2005). Susamda (*Sesamum indicum* L.) verim, yağ, oleik ve linoleik tipi hatların tarımsal ve teknolojik özellikler. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(2), 267-272.
11. Hänsel, R., Sticher, O. (2007). *Pharmakognosie-Phytopharmazie*, Medizin Verlag, Springer, Heidelberg, p.761.
12. Kurt, C. (2024). Some effects of sesame (*Sesamum indicum*) on health. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 12(7), 1231-1237. [CrossRef]
13. Namiki M. (1995). The chemistry and physiological functions of sesame. *Food Reviews International*, 11(2), 281-329. [CrossRef]
14. Healthcare, T. (2004). *PDR for Herbal Medicines*, Montvale, New Jersey, p.688.

15. Aluganti Narasimhulu, C., Burge, K.Y., Doomra, M., Riad, A., Parthasarathy, S. (2018). Primary prevention of atherosclerosis by pretreatment of low-density lipoprotein receptor knockout mice with sesame oil and its aqueous components. *Scientific Reports*, 8(1), 12270. [CrossRef]
16. Chen, P.R., Chien, K.L., Su, T.C., Chang, C.J., Liu, T.L., Cheng, H., Tsai, C. (2005). Dietary sesame reduces serum cholesterol and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolemia. *Nutrition Research*, 25(6), 559-567. [CrossRef]
17. Aslam, F., Iqbal, S., Nasir, M., Anjum, A.A. (2019). White sesame seed oil mitigates blood glucose level, reduces oxidative stress and improves biomarkers of hepatic and renal function in participants with type 2 diabetes mellitus. *Journal of the American College of Nutrition*, 38(3), 235-246. [CrossRef]
18. Heidari-Soureshjani, R., Gholipour, A., Obeidavi, Z., Jafari, A., Abbasi, S., Madmoli, Y. (2016). Bactericidal and bacteriostatic effect of sesame oil olive oil and their synergism on *Escherichia coli in vitro*. *Advanced Herbal Medicine*, 2(4), 7-12.
19. Harikumar, K.B., Sung, B., Tharakan, S.T., Pandey, M.K., Joy, B., Guha, S., Krishnan, S., Aggarwal, B.B. (2010). Sesamin manifests chemopreventive effects through the suppression of NF-kappa B-regulated cell survival, proliferation, invasion, and angiogenic gene products. *Molecular Cancer Research*, 8(5), 751-761. [CrossRef]
20. Jan, K.C., Ku, K.L., Chu, Y.H., Hwang, L.S., Ho, C.T., (2010) Tissue distribution and elimination of estrogenic and anti-inflammatory catechol metabolites from sesaminol triglucoside in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 7693-7700. [CrossRef]
21. Anagnostis, A., Papadopoulos, A.I., (2009). Effects of a diet rich in sesame (*Sesamum indicum* L.) pericarp on the expression of oestrogen receptor alpha and oestrogen receptor beta in rat prostate and uterus. *British Journal of Nutrition*, 102(5), 703-708. [CrossRef]
22. Lee, S.Y., Ha, T.Y., Son, D.J., Kim, S.R., Hong, J.T. (2005). Effect of sesaminol glucosides on beta-amyloid-induced PC12 cell death through antioxidant mechanisms. *Neuroscience Research*, 28, 186-189. [CrossRef]
23. Um, M.Y., Ahn, J.Y., Kim, S., Kim, M.K., Ha, T.Y. (2009). Sesaminol glucosides protect beta-amyloid peptide induced cognitive deficits in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(9), 1516-1520. [CrossRef]
24. Çapan, Y., Savaşer, A., Kantarcı, A.G., Karataş, A., Karasulu, E., Bilensoy, E., Baloğlu, E., Acartürk, F., Eroğlu, H., Karasulu, H.Y., Özgüney, I., Özer, K.Ö., Çetin, M., Özyazıcı, M., Demirel, M., Çelebi, N., Yüksel, N., Gürsoy, R.N., Şahin, S., Çalış, S., Güngör, S., Takka, S., Pehlivan, S., Çomoğlu, T., Uğurlu, T., Eldem, T., Özkan, Y., Erginer, Y., Devrim, B., Köse Özkan, C., Şengel Türk, C.T., Taş, Ç., Cengiz Başaran, E., Homan Gökçe, E., Badıllı, F.U., Büyükköroğlu, G., Sedef Erdal, M., Kaynak, M.S., Kılıçarslan, M., Üstündağ Okur, N., Kerimoğlu, O., Karavana, S.Y., Aktaş, Y., Sezgin Bayındır, Z., Şenyiğit, Z., Yücel Ç., Yenilmez Akıl, E., Demirbolat, G.M., Berkman, M.S., İnal, Ö., Saka, O. M., Yurdasiper, A., Eşim, Ö., Rençber, S., Tuncay Tanrıverdi, S., Tort, S., Yazıksız, Y., Sönmez, İ., Pınarbaşı, O., Aytekin, E., Akkuş, Z.B., Doğan, S.S., Arıca Yegin, B., Hasçıçek, C., Teksin, Z.Ş. (2018). *Türk Farmakopesi 2017*, T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Ankara, p.4135.
25. Stahl, E., Schild, W. (1981). *Pharmazeutische Biologie 4. Drogen Analyse II: Inhaltstoffe und Isolierungen*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, p.297-300.
26. Ademola Olaleye, A., Alhaji Adamu, Y., Lawan, U. (2019). Effects of Temperature change on the physico-chemical properties of sesame seed oil. *Science Journal of Analytical Chemistry*, 7(1), 13. [CrossRef]
27. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Alimentarius Commission. Food and Agriculture Organization of the United Nations: World Health Organization Rome. (2019). From <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/tr/>. Erişim tarihi: 23.08.2020.
28. Borchani, C., Besbes, S., Blecker, C., Attia, H. (2010). Chemical characteristics and oxidative stability of sesame seed, sesame paste, and olive oils. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 12, 585-596.
29. Benítez-Benítez, R., Ortega-Bonilla, R.A., Martin-Franco, J. (2016). Comparison of two sesame oil extraction methods: Percolation and pressed. *Biotechnology en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(1), 10-18. [CrossRef]
30. Özcan, M. (1993). Yüksek lisans tezi. Susam, susam yağı ve tahinde fiziksel-kimyasal analizler ve yağ asitleri bileşiminin belirlenmesi. Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye.



EXPLORATION OF HALLUCINOGENIC COMPOUNDS IN *PEGANUM HARMALA*, A POPULAR INCENSE IN FOLK CULTURE, COUPLED WITH ANATOMICAL ANALYSIS

HALK KÜLTÜRÜNDE POPÜLER BİR TÜTSÜ OLAN PEGANUM HARMALA'DAKİ HALÜSİNOJENİK BİLEŞİKLERİN ANATOMİK ANALİZLERLE BERABER ARAŞTIRILMASI

Merve AKDOĞAN¹ , Enes TEKMAN² , Hafize YUCA³ , Songül KARAKAYA^{2*} ,
Gülnur EKŞİ⁴ , Cavit KAZAZ⁵ 

¹Atatürk University, Institute of Natural and Applied Sciences, Department of Criminalistics, 25030, Erzurum, Türkiye

²Atatürk University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, 25240, Erzurum, Türkiye

³Atatürk University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 25240, Erzurum, Türkiye

⁴Istanbul Cerrahpaşa University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, 34116, İstanbul, Türkiye

⁵Atatürk University, Faculty of Science, Department of Chemistry, 25030, Erzurum, Türkiye

ABSTRACT

Objective: *Peganum harmala* L., commonly known as "harmala," is extensively used as an herbal incense product today and is renowned for its reported calming effects on humans. This study aims to perform a structural characterization of incense, with a particular focus on its fruit and seed components, by analyzing both the combustion process and dissolving the resulting smoke in an appropriate solvent. Additionally, we aim to contribute to the literature by investigating the presence of hallucinogenic compounds in this incense. Simultaneously, anatomical features of pedicels, petals, sepals, stamens, and pistils of *P. harmala* were examined through manual sectioning.

Material and Method: Smoke from incense was dissolved using *n*-hexane and dichloromethane solvents. Chemical analysis of seeds and fruits was conducted using GC-MS at the Erzurum Regional Criminal Police Laboratory Directorate. Anatomical characterization involved manual sectioning of pedicels, petals, sepals, and pistils, followed by examination under a microscope.

Result and Discussion: Upon analysis of samples extracted from dichloromethane and *n*-hexane solvents, the presence of harmine—a compound exhibiting hallucinogenic properties—has been identified. Harmine is known to impact human perception, cognition, and emotions by influencing central nervous system. The anatomical analysis revealed the presence of glandular trichomes on the pedicel, and sepal. Chemical compounds in smoke of *P. harmala* seeds and fruits, including hallucinogenic compound harmine, were identified through GC-MS analysis.

Keywords: Anatomy, GC-MS, harmine, incense, *Peganum harmala*

ÖZ

Amaç: Genellikle "harmala" olarak bilinen *Peganum harmala*, günümüzde insanlar üzerinde bildirilen sakinleştirici etkileriyle tanınan bitkisel bir tütsü ürünü olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışma, tütsünün meyve ve tohum bileşenlerine odaklanarak, tütsünün yakılması ve dumanının uygun bir çözücü ile çözülmesi yoluyla yapısal karakterizasyonunu

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Songül Karakaya
e-posta / e-mail: songul.karakaya@atauni.edu.tr, Tel. / Phone: +90 0442 231 55250

gerçekleştirmeyi hedeflemektedir. Ayrıca, bu tütsüde halüsinojenik bileşiklerin varlığını araştırarak literatüre katkıda bulunmayı hedeflemektedir. Eş zamanlı olarak, *P. harmala*'nın pedisel, petal, sepal, stamen ve pistillerinin anatomik özellikleri manuel kesit alma yoluyla incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Tütsü dumanı *n*-hekzan ve diklorometan çözücülerini kullanılarak çözülmüştür. Tohum ve meyvelerin kimyasal analizi Erzurum Bölge Kriminal Polis Laboratuvarı Müdürlüğü'nde GC-MS kullanılarak yapılmıştır. Anatomik karakterizasyon, pedisel, petal, sepal, stamen ve pistillerin elle kesitlerinin alınmasını takiben mikroskop altında incelenmesiyle gerçekleştirildi.

Sonuç ve Tartışma: Diklorometan ve *n*-hekzan çözücülerinden ekstre edilen örneklerin analizi sonucunda, halüsinojenik özellikler gösteren bir bileşik olan harminin varlığı tespit edilmiştir. Harminin merkezi sinir sistemini etkileyerek insan algısını, bilişini ve duygularını etkilediği bilinmektedir. Anatomik analiz sonucunda, pedisel ve sepalde salgı tüylerinin olduğu görülmüştür. *P. harmala* tohum ve meyvelerinin dumanında bulunan ve halüsinojenik bileşik harmini de içeren kimyasal bileşikler GK/ KS analizi ile tanımlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Anatomi, GK/ KS, harmin, *Peganum harmala*, tütsü

INTRODUCTION

Throughout history, individuals have harbored fears of malevolent forces such as the evil eye, evil spirits, and demons, among others. In seeking protection from these afflictions and coping with various calamities, people turned to natural remedies. Ancient civilizations extensively relied on rituals, often incorporating widespread use of incense, as offerings and sacrifices to appease the gods and mitigate adversities [1]. Incense served various purposes beyond religious rites and masked unpleasant odors, notably during funerals, and provided protection against malevolent forces like evil spirits. As civilizations feared the evil eye and magic's potential to cause harm, incense became a sought-after method of protection, highlighting its cultural significance [2].

For generations, Anatolian people have relied on prayer and protective amulets to ward off evil eyes. These include items like garlic and eggshells. Additionally, burning incense made from plants like black cumin and cloves was believed to cleanse spaces. In some regions, the tradition of lighting candles or incense at funerals persists, rooted in ancient beliefs. Incense was historically used to communicate with the deceased and is still used in funeral ceremonies today to honor their souls [3]. Archaeologists consider herbs as crucial indicators in archaeological excavations, as they were commonly used for flavoring foods and medicinal purposes in ancient times. As a result, they are frequently discovered in ancient settlements. In Anatolia, harmful seeds were notably cultivated in Gordion, capital of Phrygians, and in Gritille in Southeastern Anatolia, where they were extensively utilized in mound settlements [2]. In pre-Islamic Turkish medicine, various techniques were employed to treat certain ailments. For instance, in the treatment of conditions like demon possession, practices such as applying cold water to a patient's face or using rumen sprinkling and aloe smoking were common. Additionally, there was a prevalent tradition of creating incense to safeguard children from fairies and the evil eye [4].

In the 19th-century medical book *Yadigar*, pesticide plant "yüzerlik" or "ak hardal" is described. It is suggested that consuming seeds of white mustard up to two spoonfuls daily and sleeping for twenty nights can completely cure the person with the disease. It is noted that this remedy may not be suitable for everyone due to its intoxicating effects, which may cause dizziness. It is advised against consumption by individuals with sensitive temperaments or weak constitutions, and it is recommended to consume it at night rather than during the day [5].

P. harmala L. originates from Asia and is primarily found in regions of the Middle East, South Asia, India, and Pakistan. It is also naturally occurring in Southern Europe, North Africa, Southwest Asia, eastern parts of Tibet, and Türkiye [6,7]. *P. harmala* has served various purposes across different cultures. In India, it was utilized as a dewormer, for narcotic purposes, and antidote against snake bites. Meanwhile, Greeks and Romans employed it for stomach protection, strengthening, and treating diarrhea. In modern medicine, it is valued for its narcotic properties, particularly due to its content of harmine, a central nervous system stimulant [8]. Shamanic tribes, adhering to beliefs of shamanism, burned herbs and inhaled their smoke due to its potential effects on pineal gland in the brain tissue [9]. *P. harmala* typically contains alkaloids ranging from 4% to 7%, including significant compounds such as harmine, harmaline, harmol, and harmalol. Seeds are distinguished by a strong odor and a slightly

bitter taste, and they possess a remarkable ability to be stored for extended periods without spoiling [10]. Harmine, harmaline, harman, and similar alkaloids act as serotonin antagonists. In small doses (25-50 mg), these alkaloids found in *P. harmala* can induce moderate central nervous system stimulation, resulting in effects such as heightened mood, increased energy, improved concentration, and enhanced focus. However, at higher doses (up to 750 mg), hallucinogenic effects of these alkaloids may emerge. These effects include perceptual changes, intensified colors and patterns, and alterations in mental experiences, often leading to hallucinations [11].

Objective of this study is to conduct structural characterization of incense, focusing on fruit and seed components of *P. harmala*, through burning and dissolving its smoke with a suitable solvent. Additionally, we aim to contribute to the literature by investigating presence of hallucinogenic compounds in this incense. Simultaneously, anatomical features of various parts of the *P. harmala*, including pedicels, petals, sepals, stamens, and pistils, were examined through manual sectioning.

MATERIAL AND METHOD

Plant Material

Seeds and some fruits of *P. harmala* were acquired from herbalists in Erzurum. Additionally, in 2018 and 2019, samples of *P. harmala* during its flowering and fruiting stages were collected from Gümüşhane and Iğdır regions by faculty members of Atatürk University Department of Pharmaceutical Botany and Pharmacognosy at Faculty of Pharmacy. These samples were recorded at Atatürk University Biodiversity Application and Research Center with Herbarium number AUEF 1382.

Anatomical Studies

During flowering period, *P. harmala* was collected and preserved in 70% alcohol for subsequent anatomical studies. Sections were manually taken from pedicels, petals, sepals, stamens, and pistils of plant. These sections were examined using sartur and chloral hydrate reagents and photographed at magnifications of 4x, 10x, and 40x using a Zeiss 415500-1800-000 microscope.

Extraction of Volatile Compounds

Seeds and fruits were studied separately using *n*-hexane and dichloromethane as solvents. A novel method, developed by us for the first time, involved burning plant samples and adsorbing resulting incense to solvent using a double-entry balloon and a Clevenger apparatus (Figure 1). Combustion was facilitated using a burner flame. Since the system operated in a closed environment, necessitating temperature control and cooling, ice batteries were utilized to cool walls of balloon. To ensure complete combustion of incense, puffs were released from exit part of the balloon every 1-2 minutes.

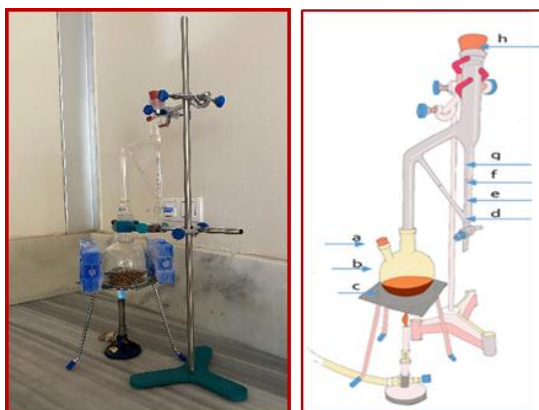


Figure 1. Experimental setup developed by us for first time for adsorption of incense to solvent: a and h: Cork Stopper (with 1-2 minute break for puff process), b: Balloon with two entries, c: Seed or fruit sample, d: Essential oil sinking to bottom, e: *n*-Hexane or dichloromethane solvent, f: Essential oil remaining on top, g: Compounds remaining on walls

After weighing 10 grams of seeds and fruits, they were transferred into a balloon connected to a Clevenger apparatus. Subsequently, 100 ml of *n*-hexane and dichloromethane was introduced into Clevenger apparatus, allowing incense to adsorb into solvent. Samples were then extracted from surfaces of Clevenger apparatus walls and balloon, capturing smoke generated by burning seeds into *n*-hexane and dichloromethane (Figures 2 and 3). These samples were analyzed via GC-MS at Chemical Investigation Branch Directorate of Erzurum Regional Criminal Police Laboratory.

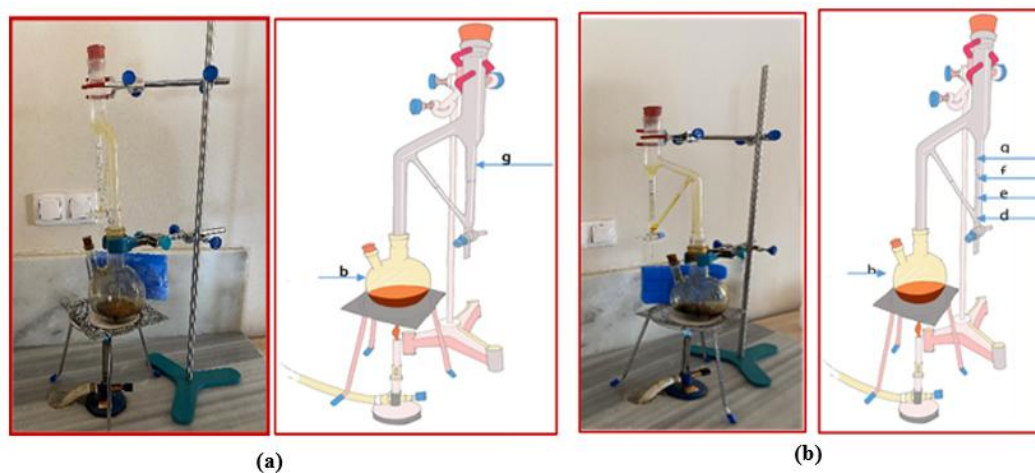


Figure 2. Seeds of *P. harmala* in *n*-hexane solvent (a) and dichloromethane solvent (b)

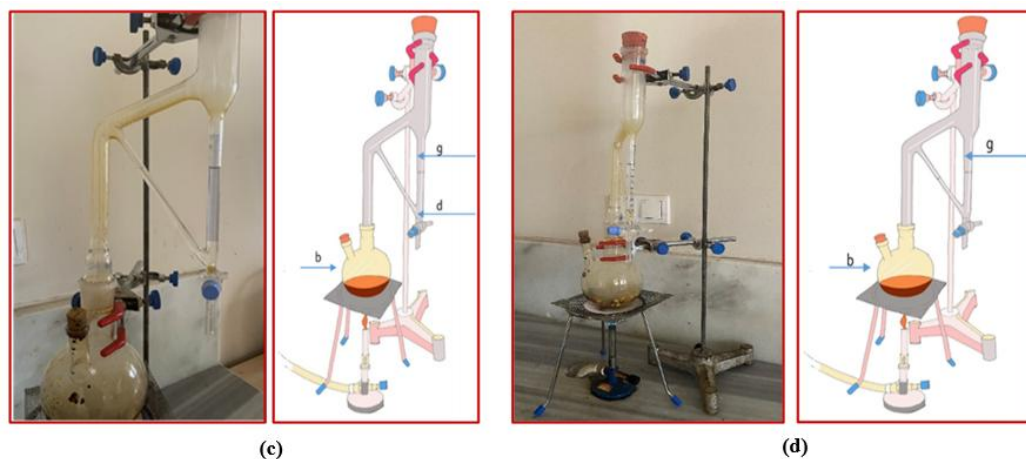


Figure 3. Fruits of *P. harmala* in *n*-hexane solvent (c) and dichloromethane solvent (d)

Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GC-MS) Conditions

GC-MS analyses were conducted at Chemical Investigation Branch Directorate of Erzurum Regional Criminal Police Laboratory using an Agilent 5977B GC-MSD device. Commercial libraries such as Cayman, SWGDRUG, and Designer Drugs Library were consulted, alongside computer-assisted matches against MS literature results, to facilitate accurate identification and characterization of compounds. GC-MS analysis conditions are shown as: Column: 30 m length, 0.25 mm inner diameter, 0.25 μm film thickness HP-5, Injection: Splitless, Injector Temperature: 260°C, Carrier Gas: Helium at a flow rate of 1 ml/min, Oven Temperature Program: Initial temperature: 80°C, Initial time: 3 min, Temperature ramp: 10°C/min, Final temperature: 280°C, Final time: 20 min, Interconnection Temperature: 290°C, Mass Spectrometer: Scanning range: 40-400 amu.

RESULT AND DISCUSSION

The primary objective of this study is to identify and analyze the anatomical structures responsible for producing and storing volatile compounds within the plant. Furthermore, the study aims to elucidate the chemical nature and composition of these volatile compounds, providing insights into their potential biological and ecological functions. Sections were manually extracted from various plant parts of *P. harmala*, including the pedicel, petal, sepal, and pistil. In the cross-sectional and superficial anatomy of the pedicel and sepal, multicellular glandular trichomes were prominently observed, suggesting their potential role in secretory functions (Figures 4, 5, and 6). In addition to the glandular structures, druses were identified in the cross-sectional anatomy of the sepal (Figure 5). Furthermore, simple crystals were noted in the superficial anatomy of the petal (Figure 7), contributing to our understanding of the crystalliferous structures within the plant. The stigma of the pistil was characterized as papillary (Figure 8), reflecting its likely role in pollen adhesion and fertilization processes. This detailed anatomical examination highlights the complex structure of *P. harmala* and its potential implications for understanding the plant's physiological functions.

The floral nectary of *P. harmala* was studied using light and electron microscopy. It appeared as a smooth, five-lobed disc around the ovary, consisting of a single-layered epidermis, 15–20 layers of subepidermal secretory cells, and larger parenchymal cells underneath. Phloem tissue, including sieve tubes and companion cells, supported the nectary. Early secretory cells contained starch grains and plastoglobuli, which disappeared as nectar secretion progressed [12]. The root, stem and leaf anatomy of the plant were studied, and it was reported that no secretory character was found [13]. The anatomical structures of *P. harmala* were analyzed. Notable stability features include the presence of ring-shaped sclerenchyma in both stems and roots, along with a bilaterally organized columnar mesophyll in the leaves [14].

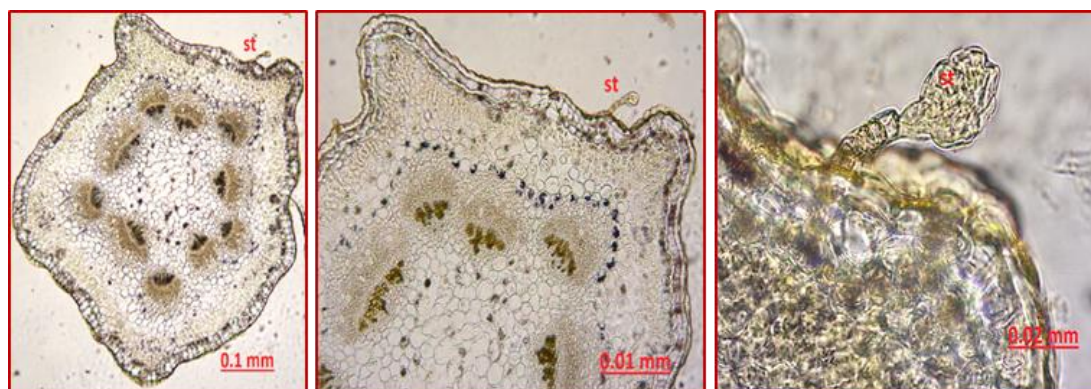


Figure 4. Multicellular glandular trichomes in cross-section of *P. harmala* pedicel. st: glandular trichome

Chemical constituents of seeds and fruits obtained from market-supplied were analyzed using GC-MS. Chromatograms and tables displaying GC-MS findings were generated as a result of analyses. Chemical compositions of volatile compounds from seeds and fruit parts of *P. harmala* were examined. Tables 1-10 were given GC/MS results.

Table 1. GC/MS results of compounds obtained by burning *P. harmala* seeds and taken from balloon walls into dichloromethane

	Compound	Time	%
1	Oleic acid methyl ester	21.8	23.114
2	Harmine	22.8	76.886
	Total		100

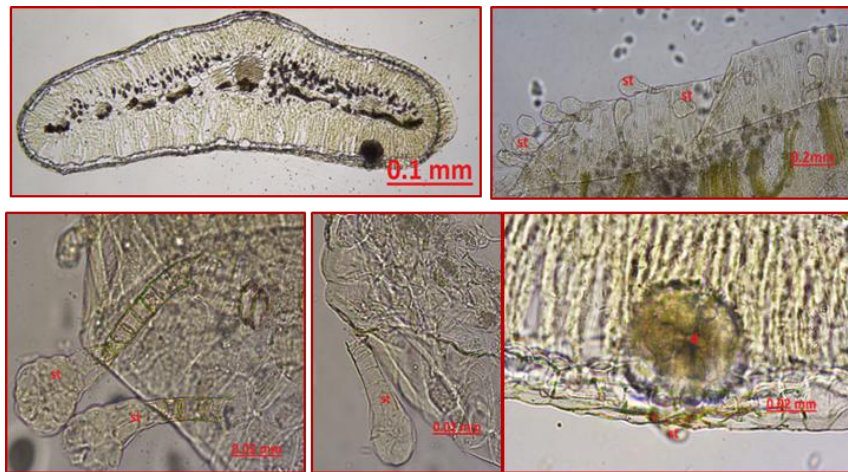


Figure 5. Multicellular glandular trichomes and druse in cross-section of *P. harmala* sepal. st: glandular trichome, d: druse

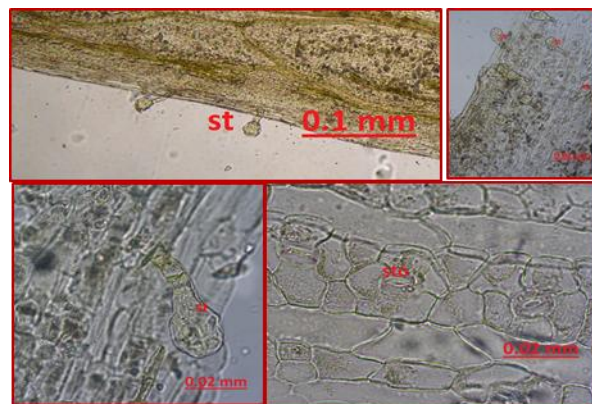


Figure 6. *P. harmala* sepal superficial section anatomy with multicellular glandular trichomes and stomata. st: glandular trichome, sto: stomata

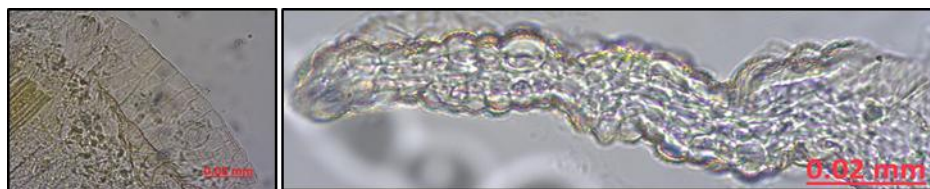


Figure 7. *P. harmala* petal anatomy

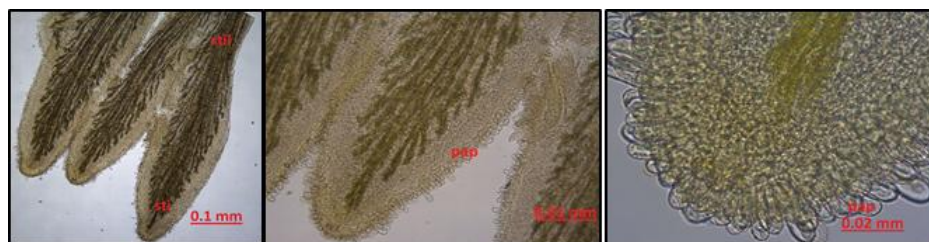


Figure 8. *P. harmala* stigma and style anatomy. sti: stigma, style: stylus, pap: papilla

Table 2. GC/MS results of compounds obtained by burning *P. harmala* seeds and taken into dichloromethane from walls of Clevenger apparatus

	Compound	Time	%
1	Pyridine	3.3	5.783
2	Heptadec-8-ene	18.9	3.595
3	Palmitic acid methyl ester	20.8	5.992
4	(Z)-9-Octadecene nitrile	21.7	9.491
5	Oleic acid methyl ester	21.8	43.505
6	Harmine	22.8	31.634
	Total		100

Table 3. GC-MS results of compounds obtained by burning *P. harmala* seeds and taken into dichloromethane

	Compound	Time	%
1	Pyridine	3.3	21.395
2	Pyrrole	3.5	5.356
3	Toluene	3.7	3.290
4	Dimethyl sulfoxide	4.9	16.835
5	2-methyl-1 <i>h</i> -pyrrole	5.0	2.398
6	2-methoxyphenol	9.7	4.604
7	Pentylbenzene	10.8	3.482
8	Palmitic acid methyl ester	20.8	2.547
9	(Z)-9-Octadecene nitrile	21.7	3.797
10	Oleic acid methyl ester	21.8	19.244
11	Harmine	22.8	17.052
	Total		100

Table 4. GC-MS results of compounds in essential oil sample obtained by burning *P. harmala* seeds and precipitated under Clevenger apparatus

	Compound	Time	%
1	Pyridine	3.3	20.510
2	Pyrrole	3.5	4.656
3	Toluene	3.7	3.018
4	Methylpyrazine	4.7	2.085
5	2-methyl-1 <i>h</i> -pyrrole	5.0	1.182
6	2-Furanmethanol	5.3	1.853
7	Aniline	5.4	0.980
8	Bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-triene	6.1	2.144
9	1-(2-Furanyl)-ethanone	6.5	2.168
10	2,3-Dimethyl-1 <i>h</i> -pyrrole	6.7	2.007
11	Propylbenzene	7.3	1.991
12	Phenol	7.8	2.362
13	Decane	8.1	3.115
14	<i>n</i> -Butylbenzene	9.2	2.983
15	<i>p</i> -Cresol	9.4	1.951
16	2-methoxyphenol	9.7	4.010
17	Undecane	9.9	2.332
18	Pentylbenzene	10.8	3.782
19	Quinazoline	12.2	1.297
20	Indole	12.9	1.864
21	1 <i>H</i> .beta.,8-dimethyl-(6 <i>H</i> .beta.) -bicyclo[4.4.1]undeca-2,4,8-triene-11-one	18.2	1.453

Table 4 (continue). GC-MS results of compounds in essential oil sample obtained by burning *P. harmala* seeds and precipitated under Clevenger apparatus

	Compound	Time	%
22	(E)-Heptadec-8-ene	18.91	1.882
23	8-Heptadecene	18.96	1.871
24	Palmitic acid methyl ester	20.8	2.077
25	(Z)-9-octadecene nitrile	21.7	2.939
26	Oleic acid methyl ester	21.8	13.916
27	Harmine	22.8	9.571
	Total		100

Table 5. GC-MS results of - essential oil formed on Clevenger apparatus obtained by burning *P. harmala* seeds

	Compound	Time	%
1	Pyridine	3.3	37.680
2	Pyrrole	3.5	8.563
3	Toluene	3.7	6.649
4	2-methyl-1h-pyrrole	5.0	4.826
5	n-Butylbenzene	9.2	5.245
6	2-methoxyphenol	9.7	7.426
7	Pentylbenzene	10.8	6.688
8	Indole	12.9	3.838
9	Palmitic acid methyl ester	20.8	2.952
10	Linoleic acid methyl ester	21.7	3.949
11	Oleic acid methyl ester	21.8	12.185
	Total		100

Table 6. GC-MS results of compounds obtained by burning *P. harmala* seeds and taken from balloon walls into n-hexane

	Compound	Time	%
1	Linoleic acid methyl ester	21.7	19.729
2	Oleic acid methyl ester	21.8	45.801
3	Harmine	22.8	34.470
	Total		100

Table 7. GC-MS results of compounds obtained by burning *P. harmala* seeds and taken into n-hexane from walls of Clevenger apparatus

	Compound	Time	%
1	Diisooctyl adipate	23.49	100
	Total		100

Table 8. GC-MS results of compounds obtained by burning *P. harmala* fruits and taken from walls of flask into dichloromethane

	Compound	Time	%
1	Harmine	22.8	100
	Total		100

This study investigates compounds with hallucinogenic effects derived from smoke of *P. harmala* seeds and fruits, a plant widely utilized in contemporary herbal incense products known for its relaxing

properties. Simultaneously, anatomical characteristics of pedicels, petals, sepals, stamens, and pistils of plants, commonly found across various regions of Türkiye and extensively utilized by public, were examined. Pedicels, petals, sepals, stamens, and pistils were manually sectioned for examination. It was observed that the volatile compounds of the plant are concentrated within multicellular secretory trichomes located on the pedicels and sepals. These specialized structures play a crucial role in the storage and secretion of volatile compounds, indicating their significance in the plant's chemical ecology and potential aromatic properties. Seeds and fruits were procured from local markets and herbalists in Erzurum. To facilitate extraction of incense, a custom-built mechanism was devised, employing a double-entry balloon and Clevenger apparatus. This apparatus enabled burning of plant and absorption of resulting smoke into solvents, namely *n*-hexane and dichloromethane. Presence of harmine in samples extracted using dichloromethane and *n*-hexane were determined.

Table 9. GC-MS results of compounds obtained by burning *P. harmala* fruits and taken into *n*-hexane from walls of Clevenger apparatus

	Compound	Time	%
1	Pyridine	3.38	100
	Total		100

Table 10. GC-MS results of compounds extracted into *n*-hexane from essential oil obtained by burning *P. harmala* fruits and precipitated under Clevenger apparatus

	Compound	Time	%
1	Pyridine	3.3	15.069
2	2,4-Pentadienenitrile	3.5	1.436
3	Pyrrole	3.6	0.927
4	Furan-2-carboxaldehyde	4.9	3.230
5	Butyrolactone	6.6	0.923
6	4-Hydroxy- <i>N</i> -methylpiperidine	7.9	0.594
7	3-Methyl-1,2-cyclopentanedione	8.7	0.764
8	3-pyridinol	10.0	3.955
9	2-Methyl-4-oxo-pentanoic acid methyl ester	10.6	0.852
10	Catechol	11.5	1.559
11	1,4:3,6-Dianhydro- α - <i>D</i> -glucopyranose	11.6	0.741
12	Quinazoline	12.2	0.853
13	Oxalic acid, monomorpholide, nonyl ester	13.5	1.058
14	4-Methylproline methyl ester	14.1	1.422
15	Deoxypeganine	20.1	2.686
16	Octahydrodipyrrolo[1,2- <i>a</i> :1',2'- <i>d</i>]pyrazine-5,10-dione, (5aR,10aR) (isomer 2)	21.0	0.920
17	2,3-Dihydro-1 <i>H</i> -pyrrolo[2,1- <i>b</i>]quinazolin-9-one	21.1	0.734
18	Harmine	22.9	61.852
19	9 <i>H</i> -Pyrido[3,4- <i>b</i>]indole, 7-methoxy-1,9-dimethyl	23.1	0.423
	Total		100

A total of 12 different samples obtained from *P. harmala* were subjected to analysis. Following are results of analysis conducted on GC-MS device, focusing on smoke produced by burning seeds and extracted using dichloromethane and *n*-hexane as solvents.

1. As a result of GC-MS analysis of samples taken with *n*-hexane as solvent; harmine compound was detected in samples taken from balloon walls.

2. As a result of GC-MS analysis of samples taken with dichloromethane as a solvent; harmine

compound was detected in sample taken from balloon walls into dichloromethane, in sample taken from walls of Clavenger apparatus into dichloromethane, in essential oil sample settled under Clavenger apparatus, and in essential oil sample formed above Clavenger apparatus.

3. As a result of analysis of samples taken with *n*-hexane as a solvent by GC-MS; harmine compound was detected in fly oil sample that settled under Clavenger apparatus.

4. As a result of GC-MS analysis of samples taken with dichloromethane as a solvent; harmine compound was detected in sample taken from balloon walls.

Results of analysis of smoke obtained by burning fruits and using dichloromethane and *n*-hexane as solvents on GC-MS device are listed below.

I. As a result of GC-MS analysis of samples taken with *n*-hexane as solvent; harmine compound was detected in fly oil sample that settled under Clavenger apparatus.

II. As a result of GC-MS analysis of samples taken with dichloromethane as a solvent; harmine compound was detected in sample taken from balloon walls.

Studies examining chemical components of extracts indicate that β -carboline and quinazoline alkaloids are significant components of plant. Herraiz et al. (2010) investigated that concentration of harmaline in various parts of plant, including seeds, fruits, and capsule walls, was determined using RP-HPLC to be 56.0 mg/g, 4.55 mg/g, and 0.54 mg/g, respectively. β -carboline alkaloids, including harmaline, harmine, harmalol, harmol, and tetrahydroharmine, were identified and quantified as main constituents in *P. harmala* extracts. Alkaloid levels were highest in seeds and roots, with negligible amounts in stems and leaves, and absence in flowers. Dry seeds contained harmine (4.3%), harmaline (5.6%), harmalol (0.6%), and tetrahydroharmine (0.1%), while roots contained harmine (2.0%) and harmol (1.4%) [11]. While harmaline and harmine are typically primary alkaloids responsible for plant's beneficial effects, numerous studies suggest that other alkaloids found in *P. harmala* also contribute to its pharmacological effects [15]. Harmaline, constitutes major alkaloid, was initially isolated by Friedemann Gebel in 1837 from seeds and roots of *P. harmala*. Harmaline and harmine, along with harmalol and harman, are β -carboline derivatives primarily concentrated in seeds and roots of plant. Tetrahydroharmine, another β -carboline derivative, is predominantly found in seeds, while harmol is sourced from seeds as well. 1-thioformyl-8- β -D-glucopyranoside-bis2,3-dihydroisopyridinopyrrol is a quinazoline derivative primarily found in the aerial parts. Deoxypeganine, deoxyvasicinone, vasicine (peganine), vasicinone, isopeganine, pegamine, peganol, peganones, and vascinones, all quinazoline derivatives, are distributed throughout various parts of whole plant. Additionally, dipegene, another quinazoline derivative, is specifically located in seeds [16]. A study was conducted to evaluate the composition of two smoke condensates obtained from the seeds of *P. harmala*, which is traditionally recognized as a disinfectant agent in Iran. This investigation aims to elucidate the chemical profile of these smoke condensates and their potential applications in disinfection. Composition of smoke preparations was analyzed using GC-MS. Primary compound identified in dichloromethane extract was harmine as in our study [17]. Chemical analysis of *P. harmala* chloroform extract revealed three alkaloids in ripe fruit and two in flower and leaves, with harmine, peganine, and harmaline found in ripe fruit and harmine and peganine in flower. Harmaline was exclusively detected in ripe fruit. Total alkaloid content comparison by TLC showed 3.12% and 3.27% in flower and ripe fruit, respectively [18]. *P. harmala* smoke has traditionally been employed as a disinfectant and air purifier in various Middle Eastern and Asian countries. The smoke collection process involved capturing the emissions from smoldering 100 grams of plant material using a specially designed apparatus, which maintained a temperature of $300 \pm 10^\circ\text{C}$ with non-continuous airflow. The resulting smoke, characterized by its acidic pH, was then trapped in a mixture of distilled water and *n*-hexane and continuously agitated. The primary objective of this study was to develop a reproducible method for generating and collecting smoke in order to analyze the chemical composition of *P. harmala* smoke and compare it to other compositions. Given its historical use in traditional medicine and the potential for generating antimicrobial and immunomodulatory compounds, further research may reveal components that could act as preventive agents against airborne infections. Furthermore, conducting toxicological studies is essential. Broadening the research focus on the medicinal properties of *P. harmala* smoke could play a crucial role in the standardization of medicinal smokes as a viable dosage form in traditional medicine and ethnopharmacology [19]. However, in this study, no substance related to alkaloid content we discovered

was identified.

Harmine is a psychoactive compound traditionally used in shamanic rituals that exerts significant effects on the central nervous system, including hallucinogenic properties. This compound can profoundly alter individuals' perceptions, thoughts, and emotions. Its psychoactive effects have garnered considerable interest in both medicinal and research contexts. As a monoamine oxidase inhibitor, harmine influences neurotransmitter transmission among nerve cells, particularly affecting serotonin, dopamine, and norepinephrine levels. This modulation can lead to various hallucinogenic experiences, which may include profound mental alterations, visual and perceptual distortions, and vivid, colorful hallucinations. Users often report emotional fluctuations and a sense of expanded consciousness. Given these diverse effects, harmine and similar compounds hold promise for further exploration in both therapeutic and experiential realms. However, use and effects of harmine may vary from person to person and may be different for each individual. Harmine can also be found in some traditional herbal mixtures used in ethnic and religious rituals. However, legal status of harmine varies between countries and local laws. It is important to comply with legal regulations regarding the use of such substances. The habit of burning incense can turn into an addiction for some people after a while. Aroma and active ingredients in incense can create relaxing and calming effects on brain, causing people to develop a desire to burn incense. Incense addiction is generally considered a mild addiction and does not pose a serious problem for most people. Therefore, it is important that the use of incense is limited and done carefully. When we look at journey of *P. harmala* from past to present, we see that it has a place in many areas from folk culture to scientific research. New usage areas emerge every day. We believe that many studies will be conducted with *P. harmala* in the future. [20-23].

ACKNOWLEDGEMENTS

Enes TEKMAN would like to thank scholarship along with their postgraduate program supported by Turkish Scientific and Technical Research Council (TUBITAK).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: M.A., H.Y., S.K., G.E.; Design: M.A., H.Y., S.K., G.E.; Control: M.A., E.T., H.Y., S.K., G.E., C.K.; Sources: M.A., E.T., H.Y., S.K., G.E., C.K.; Materials: M.A., H.Y., S.K., G.E.; Data Collection or Processing: M.A., E.T., H.Y., S.K., G.E., C.K.; Analysis or Interpretation: M.A., E.T., H.Y., S.K., G.E., C.K.; Literature Review: M.A., E.T., H.Y., S.K., C.K.; Manuscript Writing: M.A., H.Y., S.K., G.E., C.K.; Critical Review: M.A., E.T., H.Y., S.K., G.E., C.K.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

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

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

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

REFERENCES

1. Albright, W.F. (1974). The lachish cosmetic burner and esther 2:12. In: H.N. Bream, R.D. Heim, and C.A. Moore (Eds.), *Old Testament Studies in Honor of Jacob M. Myers*, (pp. 25-32). Philadelphia: Temple University Press.
2. Kırıcı, S., Kayıran, S.D., Tokuz, G. (2018). Doğu Akdeniz bölgesinde üzerlik (*Peganum harmala* L.) bitkisinin tütsü olarak kullanımı. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi*, 8(1), 1-12.
3. Ökse, A.T. (2019). MÖ üçüncü binde Orta Fırat havzasında yaşam döngüsü algısı: Gre Virike örneği. In: M. Önal, S.İ. Mutlu ve S. Mutlu (Eds.), *Harran ve Çevresi Arkeoloji* (pp.107-119). Şanlıurfa: ŞURKAV Yayınları.
4. Bayat A.H. (2016). *Tıp Tarihi*, Merkez Efendi Geleneksel Tıp Derneği, İstanbul, p.365.

5. Okutan, M.Y., Kocer, D., Yildiz, M. (2004). *Yadigâr-ı İbn-i Şerif 15. Yüzyıl Türkçe Tıp Kitabı*. In: 5. Merkez Efendi Geleneksel Tıp Günleri Anısına, (pp. 116-632). İstanbul: Yerküre.
6. Davis, P.H. (1967). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, (pp. 38-67). Vol.2, Edinburgh: Edinburgh University Press.
7. Miraj, S.A. (2016). A review study of therapeutic effects of *Peganum harmala*. *Der harmacia Lettre*, 8, 161-166.
8. Sahin, K. (2012). Master's Thesis. The Examination of Harmel Plant as Regards Turkish Folk Culture and Art. Department of Art Painting, Atatürk University, Erzurum, Turkey.
9. Ceylan, M. (2017). Master's Thesis. Traces of Shamanism in Afyonkarahisar tales. Department of Turkish Language and Literature, Ardahan University, Ardahan, Turkey.
10. Mahmoudian, M., Salehian, P., Jalilpour, H. (2002). Toxicity of *Peganum harmala*: Review and a case report. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics (IJPT)*, 1(1), 1-4.
11. Herraiz, T., González, D., Ancin-Azpilicueta, C., Arán, V.J., Guillén, H. (2010). β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 839-845. [\[CrossRef\]](#)
12. Abedini, M., Movafeghi, A.L.I., Aliasgharpour, M., Dadpour, M.R. (2013). Anatomy and ultrastructure of the floral nectary in *Peganum harmala* L. (Nitrariaceae). *Plant Species Biology*, 28(3), 185-192. [\[CrossRef\]](#)
13. Koyuncu, O., Öztürk, D., Erkara, Đ.P., Kaplan, A. (2008). Anatomical and palynological studies on economically important *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae). *Biology Diver Conservation BioDiversity*, 20, 108-115.
14. AS, S., Kudrina, N.O., Kulmanov, T.E., Kurmanbayeva, M.S., Inelova, Z.A., Shalgimbayeva, S.M. (2019). Anatomical and morphological structure of *Peganum harmala* of Almaty region and its therapeutic properties. *Pakistan Journal of Botany*, 51(2), 649-655. [\[CrossRef\]](#)
15. Shapira, Z., Terkel, J., Egozi, Y., Nyska, A., Friedman, J. (1989). Abortifacient potential for the epigeal parts of *Peganum harmala*. *Journal of Ethnopharmacology*, 27(3), 319-325. [\[CrossRef\]](#)
16. Moloudizargari, M., Mikaili, P., Aghajanshakeri, S., Asghari, M. H., Shayegh, J. (2013). Pharmacological and therapeutic effects of *Peganum harmala* and its main alkaloids. *Pharmacognosy Reviews*, 7(14), 199. [\[CrossRef\]](#)
17. Shahverdi, A.R., Monsef-Esfahani, H.R., Nickavar, B., Bitarafan, L., Khodae, S., Khoshakhlagh, N. (2005). Antimicrobial activity and main chemical composition of two smoke condensates from *Peganum harmala* seeds. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(9-10), 707-710. [\[CrossRef\]](#)
18. Iranshahy, M., Bazzaz, S.F., Haririzadeh, G., Abootorabi, B.Z., Mohamadi, A.M., Khashyarmansh, Z. (2019). Chemical composition and antibacterial properties of *Peganum harmala* L. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 9(6), 530. [\[CrossRef\]](#)
19. Faridi, P., Ghasemi, Y., Mohagheghzadeh, A. (2013). Chemical composition of *Peganum harmala* smoke and volatile oil. *Journal Of Essential Oil Bearing Plants*, 16(4), 469-473.
20. Gaujac, A., Navickiene, S., Collins, M.I., Brandt, S.D., & de Andrade, J.B. (2012). Analytical techniques for the determination of tryptamines and β -carbolines in plant matrices and in psychoactive beverages consumed during religious ceremonies and neo-shamanic urban practices. *Drug Testing and Analysis*, 4(7-8), 636-648. [\[CrossRef\]](#)
21. Brito-da-Costa, A.M., Dias-da-Silva, D., Gomes, N.G., Dinis-Oliveira, R.J., Madureira-Carvalho, Á. (2020). Toxicokinetics and toxicodynamics of ayahuasca alkaloids *N,N*-dimethyltryptamine (DMT), harmine, harmaline and tetrahydroharmine: Clinical and forensic impact. *Pharmaceuticals*, 13(11), 334. [\[CrossRef\]](#)
22. Gable, R.S. (2007). Risk assessment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids. *Addiction*, 102(1), 24-34.
23. Shepard, G. (2005). Psychoactive botanicals in ritual, religion and shamanism. *Ethnopharmacology: Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, 2, 128-182.



DEVELOPMENT AND *IN VITRO* EVALUATION OF *OLEUM ROSMARINI* BASED TOPICAL EMULGEL FORMULATION FOR RHEUMATIC DISEASE

ROMATİK HASTALIKLARA YÖNELİK *OLEUM ROSMARİNİ* BAZLI TOPIKAL EMÜLJEL FORMÜLASYONUNUN GELİŞTİRİLMESİ VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Tilbe ÇEVİKELLİ^{1*} , Nurdan TEZCAN² , Umay Merve GÜVEN² , Serpil DEMİRCİ KAYIRAN³ 

¹Bahçeşehir University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 34353, Istanbul, Türkiye

²Çukurova University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 01330, Adana, Türkiye

³Çukurova University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, 01330, Adana, Türkiye

ABSTRACT

Objective: *In this study, it was aimed to develop a topical emulgel formulation from o/w type emulsions containing Oleum rosmarini, to be used in the treatment of rheumatoid arthritis.*

Material and Method: *Carbopol 996 and HPMC were used as the water phase and Oleum rosmarini was used as oil phase in the emulsion combinations containing oil, surfactant, copolymer and plasticizer at different rates over different polymer concentrations, to select the appropriate formulation with in vitro formulation studies. Organoleptic controls of the selected formulations were made and characterizations were made in terms of pH, texture profile analysis, rheology evaluation and thermodynamic stability.*

Result and Discussion: *The pH value of the optimized formulations was in the range of 5.5-6.5. The formulations were obtained homogeneously, and no phase separation was observed. It has been observed that the emulgels provide suitable viscosity, flow properties, mechanical properties and have high stability for topical application.*

Keywords: *Essential oil, rheumatoid arthritis, Rosmarinus officinalis, topical emulgel*

ÖZ

Amaç: *Bu çalışmada romatoid artrit tedavisinde kullanılmak üzere Oleum rosmarini içeren y/s tipi emülsiyonlardan topikal bir emüljel formülasyonunun geliştirilmesi ve in vitro karakterizasyonu amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *In vitro formülasyon çalışmaları ile uygun formülasyonun seçilmesi amacıyla farklı polimer konsantrasyonlarında farklı oranlarda yağ, yüzey aktif madde, kopolimer ve plastizer içeren emülsiyon kombinasyonlarında su fazı olarak Carbopol 996 ve HPMC, yağ fazı olarak Oleum rosmarini kullanılmıştır. Seçilen formülasyonların organoleptik kontrolleri yapılmış ve pH, tekstür profili analizi, reoloji değerlendirmesi ve termodinamik stabilite açısından karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.*

Sonuç ve Tartışma: *Optimize edilen krem formülasyonların pH değeri 5.5-6.5 aralığında olup, formülasyonlar homojen bir şekilde elde edilmiş ve herhangi bir faz ayrımı gözlenmemiştir. Emüljellerin topikal uygulama için uygun viskozite, akış özellikleri, mekanik özellikler gösterdiği ve yüksek termodinamik stabiliteye sahip olduğu belirlenmiştir.*

Anahtar Kelimeler: *Esansiyel yağ, romatoid artrit, Rosmarinus officinalis, topikal emüljel*

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Tilbe Çevikelli
e-mail / e-posta: tilbe.cevikelli@bau.edu.tr, **Phone / Tel.:** +902123810020

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis is a multisystem disease of unknown cause, characterized by inflammation of the synovial membrane, leading to progressive destruction of joint cartilage, bone erosion, and chronic deformities that may also involve internal organs. Because chronic pain is a common symptom in most rheumatic diseases and the restrictive effect of pain, pain relief is one of the primary goals of antirheumatic treatment goals [1]. *Rosmarinus officinalis* (rosemary) is a medicinal plant originating from the Mediterranean and grown worldwide. Several phytochemicals with pharmacological activities can be isolated from essential oils and extracts of *Rosmarinus officinalis*. Some characteristic chemical constituents of this oil include 1,8-cineole, α -pinene, camphor, bornyl acetate, borneol, camphene, α -terpineol, limonene, and myrcene [2].

Since the direct application of essential oils might irritate the skin, topical application of essential oils requires the design of suitable carriers to eliminate irritating effects and improve patient compliance. Gels are semi-solid dispersions with many benefits, but there are still a lot of restrictions when they relate to how hydrophobic pharmaceuticals can be distributed. To overcome these restrictions, hydrophobic pharmaceuticals can be combined in an emulsion before being added to gels, which are known as emulgels [3]. Emulgels combine the advantages of emulsions with gel technology. Emulgels are oil-in-water (o/w) or water-in-oil (w/o) emulsion-type semi-solid dosage forms with an opaque appearance in which the therapeutic ingredient is encapsulated in the internal phase, permeates through the external phase, and eventually absorbs into the skin to produce a controlled effect [3]. The penetration-enhancing effect of emulgel-based essential oil formulations helps active phytochemicals penetrate the skin. In addition to acting as a matrix for essential oil delivery, emulgels shield the volatile oils from decomposition.

Along with the oil phase content, gelling agents are the key ingredients for the development of emulgels. A variety of gelling agents are utilized, including natural, semi-synthetic, and synthetic types. As a result of the main drawback of natural gelling agents' high microbial breakdown susceptibility, semisynthetic and synthetic gelling ingredients are increasingly utilized in the formulation of emulgels, including hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) and carbopol polymers [4].

The aim of this study is to develop an alternative emulgel formulation with HPMC and carbopol as gelling agents, and the *Oleum rosmarini* due to its anti-inflammatory and analgesic effects in the treatment of rheumatoid arthritis; and to investigate its *in vitro* characterization.

MATERIAL AND METHOD

Materials

HPMC, Carbopol 996, triethanolamine (TEA), Tween 20, and propylene glycol were bought from Sigma-Aldrich (USA). *Oleum rosmarini* was bought from Talya Bitkisel (Antalya, Turkey).

Methods

Formulation Studies

Emulgel formulations were prepared by the emulsification technique. Carbopol 996 and HPMC were used as the water phase, and *Oleum rosmarini* was added as the oil phase. Tween 20 was applied as a surfactant, while propylene glycol was added as a plastizer. Different ratios of the formulation ingredients were evaluated, given in Table 1.

Among the formulations that are suitable in terms of the specified features, the most ideal formulation in which the active ingredient *Oleum rosmarini* was used highest and the excipients were used less was determined [5,6].

Based on the determined F33 formulation, 6 more formulations were prepared by making changes to various components, as presented in Table 2.

Table 1. Composition of different emulgel formulations prepared in preformulation studies

Code	Water Phase				Oil Phase		
	Carbopol (g)	HPMC (g)	TEA (g)	Distilled water (qs)	<i>Oleum rosmarini</i> (g)	Tween 20 (g)	Propylene glycol (g)
F1	1.0	2	-	100	20	3	5
F2	0.5	2	-	100	20	3	5
F3	0.1	2	-	100	20	3	5
F4	1.0	5	-	100	20	3	5
F5	0.5	5	-	100	20	3	5
F6	0.1	5	-	100	20	3	5
F7	1.0	2	0.50	100	20	3	5
F8	0.5	2	0.25	100	20	3	5
F9	0.1	2	0.10	100	20	3	5
F10	1.0	5	0.50	100	20	3	5
F11	0.5	5	0.25	100	20	3	5
F12	0.1	5	0.10	100	20	3	5
F13	1.0	2	-	100	20	6	5
F14	0.5	2	-	100	20	6	5
F15	0.1	2	-	100	20	6	5
F16	1.0	5	-	100	20	6	5
F17	0.5	5	-	100	20	6	5
F18	0.1	5	-	100	20	6	5
F19	1.0	2	0.50	100	20	6	5
F20	0.5	2	0.25	100	20	6	5
F21	0.1	2	0.10	100	20	6	5
F22	1.0	5	0.50	100	20	6	5
F23	0.5	5	0.25	100	20	6	5
F24	0.1	5	0.10	100	20	6	5
F25	1.0	2	-	100	30	3	5
F26	0.5	2	-	100	30	3	5
F27	0.1	2	-	100	30	3	5
F28	1.0	5	-	100	30	3	5
F29	0.5	5	-	100	30	3	5
F30	0.1	5	-	100	30	3	5
F31	1.0	2	0.50	100	30	3	5
F32	0.5	2	0.25	100	30	3	5
F33	0.1	2	0.10	100	30	3	5
F34	1.0	5	0.50	100	30	3	5
F35	0.5	5	0.25	100	30	3	5
F36	0.1	5	0.10	100	30	3	5
F37	1.0	2	-	100	30	6	5
F38	0.5	2	-	100	30	6	5
F39	0.1	2	-	100	30	6	5
F40	1.0	5	-	100	30	6	5
F41	0.5	5	-	100	30	6	5
F42	0.1	5	-	100	30	6	5
F43	1.0	2	0.50	100	30	6	5
F44	0.5	2	0.25	100	30	6	5
F45	0.1	2	0.10	100	30	6	5
F46	1.0	5	0.50	100	30	6	5
F47	0.5	5	0.25	100	30	6	5
F48	0.1	5	0.10	100	30	6	5

Table 2. Formulations prepared by changing the component amounts over the F33 formulation

Code	Water Phase				Oil Phase		
	Carbopol (g)	HPMC (g)	TEA (g)	Distilled water (qs)	<i>Oleum rosmarini</i> (g)	Tween 20 (g)	Propylene glycol (g)
F49	0.1	2	0.1	100	30	1	5
F50	0.1	2	0.1	100	30	3	2.5
F51	0.1	2	0.1	100	30	3	10
F52	0.1	2	-	100	30	1	5
F53	0.1	2	-	100	30	3	2.5
F54	0.1	2	-	100	30	3	10

Characterization of the Emulgels

Organoleptic Properties

Various organoleptic properties, including appearance, homogeneity, phase separation, spreadability, and immediate skin feeling upon application, were examined for every formulation. Visual assessments were made of appearance and phase separation properties. Sensory characteristics were assessed by rubbing emulgels into the skin on the dorsal side of the hand or between two fingers [7]. Homogeneity was evaluated by pressing a standard amount (100 mg) of the formulations between the thumb and the index finger in order to notice the consistency of the emulgel and whether any coarse particles were being adhered to or removed from the finger [8].

pH

pH values of the emulgels were determined with a digital pH meter (Mettler Toledo, Switzerland) in triplicate, and average values with standard deviations were recorded [9].

Texture Profile Analysis (TPA)

The mechanical properties of the emulgels, including hardness, adhesiveness, cohesiveness, and compressibility, were evaluated using a texture analyzer (TA.XT.PlusC, Stable Micro System, Haslemere, Surrey, UK), equipped with a 5 kg load cell. The tests were performed with a Perspex probe having a 10 mm diameter (SNSP/10, h : 10 mm) and 20 g of each emulgel formulation placed into a suitable beaker at 25 ± 0.5 °C. The pre-test, test, and post-test speeds were 2 mm/s each, with a trigger force of 0.001 N. The compression depth in each test was 10 cm, and the delay period between two compressions was 10 s. All measurements were done in triplicate for each formulation, and the Texture Exponent Connect 8.0.5.0 software package was used to determine the mechanical properties of the emulgels [10].

Rheological Properties

Rheological measurements, including shear stress, shear rate, and apparent viscosity, were performed using a cone and plate Brookfield rheometer (Brookfield DV3THACJ0, Middleboro, MA, USA) in triplicate in a temperature-controlled environment at 25 ± 0.5 °C, and rotational speed was ranged from 10-100 rpm. Data were obtained by the RheoWin 4.87.0006 (Haake®) software [9].

Stability Evaluation

The prepared emulgel formulations were characterized in heating-cooling cycles and centrifuge conditions to evaluate their thermodynamic stability. The samples were evaluated in terms of phase separation and physical appearance under stress conditions. Emulgels were incubated at 4 and 40 °C (24 h) for 3 cycles and examined for phase separation. Additionally, a centrifuge test was performed for 10 minutes at 3500 rpm with 3 repetitions [11].

RESULT AND DISCUSSION

Rosemary essential oil is reported to have many biological activities such as antioxidant, anticarcinogenic, antibacterial, analgesic and antimicrobial, antifungal, antioxidant, and anti-inflammatory activities [12,13]. Among the chemical components of rosemary essential oil, 1,8-cineole, α -pinene, camphor, bornyl acetate, borneol, camphene, α -terpineol, limonene, β -pinene, β -caryophyllene, and myrcene compounds are defined as the characteristic components of this oil [2]. The pharmacological activities of *Rosmarinus officinalis* essential oil are attributed to its 1,8-cineole, camphor, and α -pinene components. *Rosmarinus officinalis* is employed in traditional medicine for its antiinflammatory, analgesic, and antibacterial properties in muscles and joints [14]. Because of its antiinflammatory and antiarthritic properties, *Rosmarinus officinalis* has shown promise in modulating rheumatoid arthritis, with the *in vivo* studies in the literature [15].

Topical application stands out in terms of providing the opportunity to administer drugs with a non-invasive method and also with its advantages, such as not being exposed to first pass metabolism, reduced side effects, ease of application, and also removal, thus improving patient compliance [16,17]. Recently, delivery of bioactive molecules derived from medicinal plants by the topical formulations gained increasing interest due to improving the biological qualities and bioavailability of the plant constituents in treatment of various conditions [18].

One of the formulations developed for topical application is emulgels. Emulgels are described as semi-solid emulsions of either the w/o or the o/w type dosage forms, with consistency varying according to the type of oil and gelling agent used [19]. Emulsions are heterogeneous systems in which one phase is finely dispersed in another, and the dispersed phase can be hydrophobic-based (w/o) or aqueous-based (o/w) [20]. Oil-in-water emulsions are widely used in various industrial applications, such as the food industry, pharmaceutical, or cosmetic fields [21]. In our study, o/w emulsion-type emulgel formulations were developed as Carbopol 996, HPMC, and TEA in the water phase; Tween20, propylene glycol, and rosemary oil were used as the oil phase.

Rosemary oil is included in the formulation as the active ingredient and is added to the internal phase due to its volatile properties. In all developed emulgel formulations, the inner phase is determined as the oil phase and the continuous phase as the water phase.

Carbopol is a high molecular weight synthetic polymer of acrylic acid that helps formulate low-irritating topical dosage forms, providing good characteristics, skin feel, and drug penetration properties [22]. The most appealing features of carbopol as a mucoadhesive agent for topical application are that it is less costly, non-irritating, biodegradable, and not absorbed into the body [23].

HPMC is one of the most frequently used cellulosic polymers available to develop topical drug delivery systems. HPMC can be employed for emulsification, adhesion, thickening, film formation, and gelation, depending on the molecular weight and viscosity selected. It is composed of linked polymeric units that hold onto water, making it a great hydrophilic gel-forming polymer [24]. Furthermore, HPMC exhibits minimal drug interaction and has been shown to promote bioadhesion and local drug delivery by improving retention [25].

Surfactants are components that enable the formation of stable emulsions. While o/w emulsions are prepared with hydrophilic surfactants, w/o emulsions are prepared with lipophilic substances. Surfactants are adsorbed at the oil-water interface, reducing the interfacial tension and ensuring stable mixing of water and oil [26]. In recent years, surfactants such as polysorbates (Tweens) and co-surfactants such as propylene glycol have been used widely in the formulations [27,28].

Propylene glycol is a widely used excipient in many cosmetics, topical skin preparations, medications, and foods [29]. It is known that this excipient is safe to use even at high concentrations. Although it acts as a co-solvent in some preparations, it is also preferred in many formulations due to its skin care properties [30]. Due to the advantages of propylene glycol, such as being safe at high concentrations and being widely used, a fixed concentration of propylene glycol was used in our formulations.

Tween 20 was used as a surfactant in the developed formulations. The HLB value of Tween 20 is known to be approximately 16.7 [31]. This value ensures that the hydrophilic feature of the substance is high and that it has the ability to make water into the outer phase of the formulation [32]. As a

surfactant, Tween 20 has the ability to mix with both phases. While preparing the formulations, it was dispersed in the oil phase. Surfactants found in topical formulations can increase skin permeability and affect the physicochemical properties of the formulation, as well as causing skin irritation [33]. For this reason, surfactant concentrations were used within confidence limits when developing the formulation.

Characterization of the Emulgels

Within the scope of our study, organoleptic controls, pH analysis, TPA, rheological measurements, and thermodynamic stability analyses were carried out as characterization studies in the formulations. In organoleptic controls, it was examined in terms of color, spreadability, phase separation, homogeneity, and appearance.

Spreadability properties analyzed in organoleptic evaluation play a key role in defining both the efficiency of the product and its acceptance by the consumer. Reliability was evaluated at three levels: poor, moderate, and good.

Some of the emulgels developed in preformulation studies had phase separation, coarse particles, or non-ideal properties, as presented in Table 3. All optimized formulations developed in the study had a smooth texture and no evidence of phase separation. A physical evaluation was performed by pressing a small amount of the formulation between the thumb and the index finger. Based on the spreadability, appearance, homogeneity, and stability, F27, F31, F32, and F33 formulations were found to be satisfactory. Among these four formulations, F33 was chosen for deriving six additional formulations (F49, F50, F51, F52, F53, and F54) by modifying the formulation components due to having the highest *Oleum rosmarini* and the least excipient content. As a result of thermodynamic characterization studies, phase separation was observed in the F52 and F53 formulations. It was observed that other optimized formulations were homogeneous and consistent without containing any coarse particles. In terms of the immediate skin feeling after application, most formulations did not leave an oily feeling, and they are thought to be ideal in terms of spreadability.

Table 3. Organoleptic evaluation of the emulgel formulations

Formulation	Spreadability	Phase Separation	Homogeneity	Immediate Skin Feel	Appearance
F1	+	No separation	Homogeneous	Poor	Good
F2	++	No separation	Not	Good	Good
F3	+++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F4	+++	No separation	Homogeneous	Moderate	Good
F5	++	No separation	Not	Good	Poor
F6	+	No separation	Not	Moderate	Poor
F7	+	No separation	Homogeneous	Moderate	Moderate
F8	++	No separation	Homogeneous	Moderate	Moderate
F9	+++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F10	++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F11	++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F12	++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F13	+++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F14	++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F15	+++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F16	+	No separation	Not	Moderate	Moderate
F17	+	No separation	Not	Poor	Poor
F18	+	Separation	Not	Poor	Poor
F19	++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F20	+	No separation	Not	Poor	Poor
F21	+	Separation	Not	Poor	Poor
F22	+	Separation	Not	Poor	Poor
F23	+	No separation	Not	Moderate	Poor
F24	+	Separation	Not	Poor	Poor

Table 3 (continue). Organoleptic evaluation of the emulgel formulations

Formulation	Spreadability	Phase Separation	Homogeneity	Immediate Skin Feel	Appearance
F25	+	Separation	Not	Poor	Poor
F26	+++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F27	+++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F28	+	No separation	Homogeneous	Good	Good
F29	++	No separation	Homogeneous	Moderate	Moderate
F30	+	No separation	Homogeneous	Moderate	Good
F31	+++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F32	+++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F33	+++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F34	+	No separation	Not	Moderate	Poor
F35	+	Separation	Not	Poor	Poor
F36	++	No separation	Homogeneous	Moderate	Good
F37	++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F38	++	No separation	Homogeneous	Moderate	Good
F39	++	No separation	Homogeneous	Moderate	Good
F40	+	No separation	Not	Poor	Poor
F41	+	No separation	Not	Moderate	Poor
F42	+	Separation	Not	Poor	Poor
F43	++	No separation	Homogeneous	Moderate	Good
F44	++	No separation	Homogeneous	Moderate	Good
F45	++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F46	++	No separation	Homogeneous	Moderate	Good
F47	+	No separation	Not	Moderate	Moderate
F48	+	No separation	Homogeneous	Moderate	Good
F49	+++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F50	+++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F51	+++	No separation	Homogeneous	Good	Good
F52	+	Separation	Not	Poor	Poor
F53	+	Separation	Not	Poor	Poor
F54	+++	No separation	Homogeneous	Good	Good

* +++: proper spreadability, ++: moderate spreadability, +: not spreadable

Upon organoleptic evaluation, F27, F31, F32, F33, F49, F50, F51, and F54 were chosen for further studies due to their better spreadability, stability (phase separation), homogeneity, immediate skin feel, and physical appearance for topical application.

pH values of the formulations were determined between 5.4 ± 0.1 and 6.3 ± 0.1 , respectively (Table 4), and found to be suitable for topical delivery [34].

Rheological properties, depending on the formulation viscosity, elasticity, and flow model, affect the manufacturing, appearance, packaging, long-term stability, and in vivo performance of the product. Biopharmaceutical properties such as drug release and permeation may also vary depending on the rheological profile of the formulation. For these reasons, rheology behavior is an important feature to determine the compliance of semisolid formulations with quality standards appropriate to the target product profile [33]. Since viscosity can affect the release of the drug by changing the diffusion rate, it holds significance in the behavior of semi-solid formulations [16,35]. When the rheograms of the selected formulations are examined, the viscosity values of the formulations at the same shear stress are as follows in increasing order: F54, F27, F51, F33, F50, F49, F32, F31 (Table 4). It was observed that F31 and F32 formulations had a much higher viscosity value compared to other formulations against the same shear stress, and addition of the TEA increased the viscosity of the formulations [36].

It is thought that these two formulations are not suitable in terms of spreadability and will prevent the active ingredient from passing into the skin. For these reasons, therapeutic effectiveness and bioavailability may be lower compared to other formulations.

Table 4. pH and viscosity values of the emulgel formulations

Formulation	pH \pm SD	Viscosity (mPa.s) \pm SD
F27	5.7 \pm 0.1	296 \pm 17
F31	6.2 \pm 0.1	665 \pm 82
F32	6.3 \pm 0.1	664 \pm 28
F33	6.2 \pm 0.1	377 \pm 2
F49	5.8 \pm 0.1	396 \pm 12
F50	5.9 \pm 0.1	353 \pm 5
F51	6.1 \pm 0.1	336 \pm 2
F54	5.4 \pm 0.1	249 \pm 15

When stress is applied to topical semi-solid dosage forms by increasing the shear rate, it decreases the viscosity, which makes it easier to apply to the skin, implying a non-Newtonian behavior [37]. Therefore, a certain critical stress value (shear stress) is required for the formulation to start flowing. Below this value, the formulations show largely elastic properties, while above this value, they generally show plastic flow [38]. When the rheograms were examined (Figure 1-2), the shear rate versus shear stress was evaluated, and a system that became thinner as the stress increased was observed, and as the shear rate increased, the viscosity decreased [39]. This indicates that the prepared formulations show pseudoplastic flow properties. Significant deviations were observed in the rheograms of F31 and F32 formulations compared to other formulations, flow property was preserved in F27, F33, F49, F50, F51, and F54 formulations.

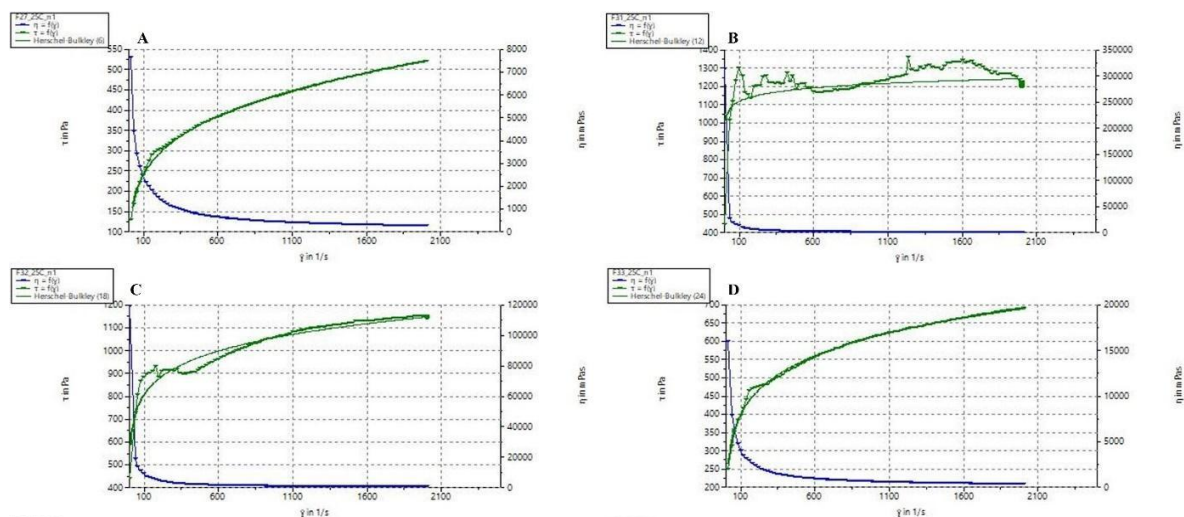


Figure 1. Rheograms of the formulations measured at 25°C. (A: F27, B: F31, C: F32, D: F33). (τ : shear stress, $\dot{\gamma}$: shear strain, Pa: stress in pascals; x axis = $\dot{\gamma}$ in 1/s, y axis = τ in Pa)

The most widely utilized method for analyzing the mechanical characteristics of pharmaceutical semi-solid formulations is TPA, which can be used to supplement rheological data by identifying interactions between formulation components [40]. The hardness is the force needed to attain deformation, thus involving the removal of formulation from the packaging in the first place and helping determine the degree of deformation [41]. When the hardness of the formulations is compared, it is

observed that the hardness of the F31 and F32 formulations is quite high compared to other formulations. On the other hand, the lowest hardness values were observed in F27 and F33 formulations (Table 5). The work required to overcome the attractive force between the surface of the sample and the probe is related to the adhesion parameter [42]. A high adhesion value contributes to bioavailability by increasing the retention time of the drug [43].

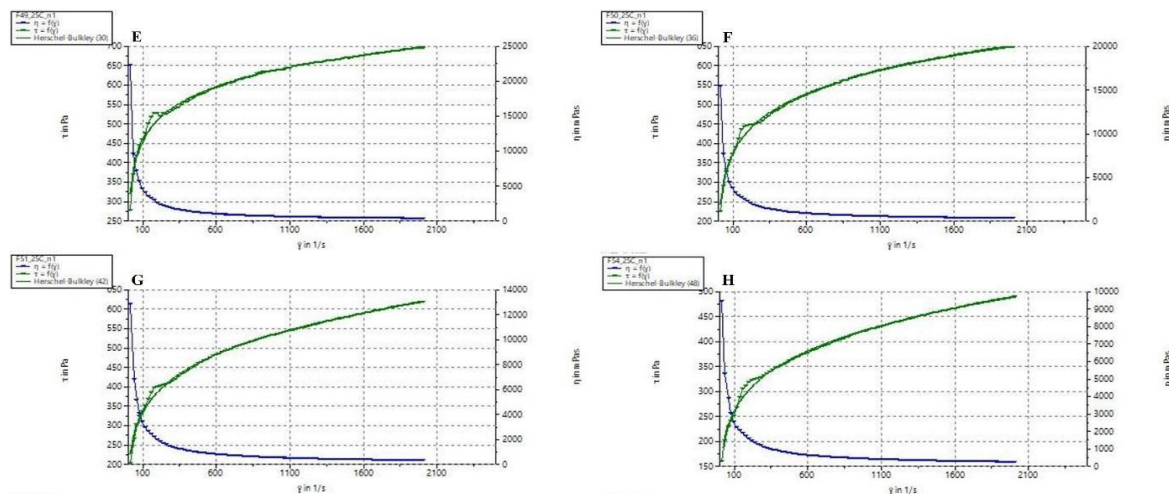


Figure 2. Rheograms of the formulations measured at 25°C. (E: F49, F: 50, G: F51, H: F54). (τ : shear stress, $\dot{\gamma}$: shear strain, Pa: stress in pascals; x axis = $\dot{\gamma}$ in 1/s, y axis = τ in Pa)

Cohesion refers to the internal strength of the bonds to hold the network together [44]. Among the formulations developed, the formulation with higher adhesion and lower cohesion values results in low interaction with the skin and accordingly provides high ease of application [41]. Accordingly, while the adhesion property was higher in the F31 and F32 formulations compared to the others, approximate values were observed in the other formulations, and at the same time, the cohesion value showed the lowest value in the F33 formulation. For this reason, the spreadability of the F33 formulation and therefore patient compliance is thought to be high. Formulations F31 and F32 are found to be not suitable due to their high adhesion and hardness properties (Table 5). This finding is also supported by rheology results in terms of viscosity and flow models of the formulations (Table 4, Figure 1-2).

Table 5. TPA of the emulgel formulations.

Formulation	Hardness (N) ± SD	Compressibility (N.mm) ± SD	Adhesiveness (N.mm) ± SD	Cohesiveness ± SD
F27	0.016 ± 0.001	0.019 ± 0.001	0.047 ± 0.002	0.899 ± 0.004
F31	0.152 ± 0.016	0.195 ± 0.028	0.142 ± 0.011	0.949 ± 0.047
F32	0.157 ± 0.022	0.247 ± 0.034	0.151 ± 0.018	0.936 ± 0.022
F33	0.020 ± 0.001	0.025 ± 0.001	0.060 ± 0.002	0.855 ± 0.073
F49	0.030 ± 0.001	0.041 ± 0.000	0.071 ± 0.001	0.916 ± 0.019
F50	0.022 ± 0.000	0.026 ± 0.001	0.061 ± 0.002	0.882 ± 0.014
F51	0.024 ± 0.001	0.028 ± 0.001	0.063 ± 0.000	0.878 ± 0.023
F54	0.029 ± 0.000	0.025 ± 0.001	0.054 ± 0.002	0.862 ± 0.035

Conclusion

In this study, an emulsion-type emulgel was prepared using *Oleum rosmarini* for use in the treatment of rheumatoid arthritis [18]. The prepared emulgels were evaluated in terms of pH, viscosity,

rheological properties, thermodynamic stability, organoleptic properties, and texture profile analyses. While preparing the emulgels, different proportions of HPMC, carbopol, propylene glycol, TEA, Tween 20, and rosemary oil were used, and among the formulations, characterization tests continued with F27, F31, F32, F33, F49, F50, F51, F52, F53 and F54. The stability of emulgels was tested against the stress conditions, including heating-cooling cycles and centrifuge conditions. Upon evaluation of thermodynamic stability, there was no observed phase separation except for F52 and F53 formulations. Further studies continued with F27, F31, F32, F33, F49, F50, F51 and F54. The prepared emulgel formulations showed good spreadability on the skin. In organoleptic examinations of the formulations, it was observed that they were ideal in terms of homogeneity and immediate skin feel. As a result of rheological examinations, it was observed that the optimized formulations were suitable for pseudoplastic flow type. As a result of *in vitro* characterization tests, the F33 formulation was thought to be ideal in comparison with the others. In this study, a suitable formulation in terms of its physicochemical properties was developed by using rosemary oil, an active ingredient of natural origin.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: T.Ç., N.T., U.M.G., S.D.K.; Design: T.Ç., N.T., U.M.G., S.D.K.; Control: T.Ç., U.M.G.; Sources: U.M.G., S.D.K.; Materials: U.M.G., S.D.K.; Data Collection and/or Processing: T.Ç., N.T., U.M.G.; Analysis and/or Interpretation: T.Ç., N.T., U.M.G.; Literature Review: N.T., U.M.G.; Manuscript Writing: T.Ç., N.T., U.M.G.; Critical Review: T.Ç., N.T., U.M.G., S.D.K.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

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

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

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

REFERENCES

1. Adami, G., Fassio, A., Rossini, M., Caimmi, C., Giollo, A., Orsolini, G., Viapiana, O., Gatti, D. (2019). Osteoporosis in rheumatic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5867.
2. Borges, R.S., Ortiz, B.L.S., Pereira, A.C.M., Keita, H., Carvalho, J.C.T. (2019). *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of Ethnopharmacology*, 229, 29-45. [\[CrossRef\]](#)
3. Talat, M., Zaman, M., Khan, R., Jamshaid, M., Akhtar, M., Mirza, A.Z. (2021). Emulgel: An effective drug delivery system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 47(8), 1193-1199. [\[CrossRef\]](#)
4. Malavi, S., Kumbhar, P., Manjappa, A., Chopade, S., Patil, O., Kataria, U., Dwivedi, J., Disouza, J. (2022). Topical emulgel: Basic considerations in development and advanced research. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(5). [\[CrossRef\]](#)
5. Santos, J., Jimenez, M., Calero, N., Alfaro, M.C., Muñoz, J. (2019). Influence of a shear post-treatment on rheological properties, microstructure and physical stability of emulgels formed by rosemary essential oil and a fumed silica. *Journal of Food Engineering*, 241, 136-148. [\[CrossRef\]](#)
6. Mohammadifar, M., Aarabi, M.H., Aghighi, F., Kazemi, M., Vakili, Z., Memarzadeh, M.R., Talaei, S.A. (2021). Anti-osteoarthritis potential of peppermint and rosemary essential oils in a nanoemulsion form: behavioral, biochemical, and histopathological evidence. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21, 1-12. [\[CrossRef\]](#)
7. Bogdan, C., Moldovan, M.L., Man, I.M., Crişan, M. (2016). Preliminary study on the development of an antistretch marks water-in-oil emulgel: Ultrasound assessment, texture analysis, and sensory analysis. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 249-255. [\[CrossRef\]](#)
8. Jhawar, V., Gupta, S., Saini, V. (2016). Formulation and evaluation of novel controlled release of topical pluronic lecithin organogel of mefenamic acid. *Drug Delivery*, 23(9), 3573-3581. [\[CrossRef\]](#)
9. Güven, U.M., Çevikelli, T., Songüloğlu, S., Kayıran, S.D. (2023). Preparation and *in vitro* characterization of lidocaine loaded aloe vera gel formulation for the treatment of burn wounds. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 47(3), 1041-1052. [\[CrossRef\]](#)

10. Cevher, E., Taha, M.A.M., Orlu, M., Araman, A. (2008). Evaluation of mechanical and mucoadhesive properties of clomiphene citrate gel formulations containing carbomers and their thiolated derivatives. *Drug Delivery*, 15(1), 57-67. [\[CrossRef\]](#)
11. Yayé, H.S., Faucheron, A., Dupont, L., El Kouari, F., Fekkar, A., Bellanger, A., Tilleul, P. (2020). Management of diabetic foot ulcers: A 25% lidocaine topical emulgel formulation design, physicochemical and microbiological assessments. *European Journal of Hospital Pharmacy*, 27(3), 162-167. [\[CrossRef\]](#)
12. Labib, R.M., Ayoub, I.M., Michel, H.E., Mehanny, M., Kamil, V., Hany, M., Magdy, M., Moataz, A., Maged, B., Mohamed, A. (2019). Appraisal on the wound healing potential of *Melaleuca alternifolia* and *Rosmarinus officinalis* L. essential oil-loaded chitosan topical preparations. *PLoS One*, 14(9). [\[CrossRef\]](#)
13. Takaki, I., Bersani-Amado, L.E., Vendruscolo, A., Sartoretto, S.M., Diniz, S.P., Bersani-Amado, C. A., Cuman, R.K.N. (2008). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. *Journal of Medicinal Food*, 11(4), 741-746. [\[CrossRef\]](#)
14. Andrade, J.M., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, C.P., Rijo, P. (2018). *Rosmarinus officinalis* L.: An update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Science OA*, 4(4). [\[CrossRef\]](#)
15. Wei, T., Liu, Y., Li, M. (2021). Anti-inflammatory and anti-arthritis activity of rosmarinic acid isolated from *rosmarinus officinalis* in an experimental model of arthritis. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 55, 507-516. [\[CrossRef\]](#)
16. Gilbert, L., Picard, C., Savary, G., Grisel, M. (2013). Rheological and textural characterization of cosmetic emulsions containing natural and synthetic polymers: Relationships between both data. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 421, 150-163. [\[CrossRef\]](#)
17. Jorge, L.L., Feres, C.C., Teles, V.E. (2010). Topical preparations for pain relief: Efficacy and patient adherence. *Journal of Pain Research*, 4, 11-24. [\[CrossRef\]](#)
18. Gwarzo, I.D., Mohd Bohari, S.P., Abdul Wahab, R., Zia, A. (2022). Recent advances and future prospects in topical emulgels from medicinal plants to expedite wound healing: A review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 36(1), 82-94. [\[CrossRef\]](#)
19. Chauhan, L., Gupta, S. (2020). Creams: A review on classification, preparation methods, evaluation and its applications. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(5-s), 281-289. [\[CrossRef\]](#)
20. Bhowmik, D., Gopinath, H., Kumar, B.P., Duraiavel, S., Kumar, K.P.S. (2012). Recent advances in novel topical drug delivery system. *The Pharma Innovation*, 1(9), 12-31.
21. Ionova, Y., Wilson, L. (2020). Biologic excipients: Importance of clinical awareness of inactive ingredients. *PLoS One*, 15(6). [\[CrossRef\]](#)
22. Safitri, F.I., Nawangsari, D., Febrina, D. (2021, January). Overview: Application of carbopol 940 in gel. In *International Conference on Health and Medical Sciences (AHMS 2020)*, 34, 80-84. [\[CrossRef\]](#)
23. Hamdi, N.A.M., Azmi, N.A., Sabari, N.H.M., Harun, A.F., Haris, M.S. (2023). An insight into the use and advantages of Carbopol in topical mucoadhesive drug delivery system: A systematic review. *Journal of Pharmacy*, 3(1), 53-65.
24. Guarve, K., Kriplani, P. (2021). HPMC-a marvel polymer for pharmaceutical industry-patent review. Recent advances in drug delivery and formulation: Formerly Recent Patents on Drug Delivery & Formulation, 15(1), 46-58. [\[CrossRef\]](#)
25. Pan, P., Svirskis, D., Waterhouse, G.I., Wu, Z. (2023). Hydroxypropyl methylcellulose bioadhesive hydrogels for topical application and sustained drug release: The effect of polyvinylpyrrolidone on the physicochemical properties of hydrogel. *Pharmaceutics*, 15(9), 2360. [\[CrossRef\]](#)
26. Kothekar, S.C., Ware, A.M., Waghmare, J.T., Momin, S.A. (2007). Comparative analysis of the properties of Tween-20, Tween-60, Tween-80, Arlacel-60, and Arlacel-80. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 28(3), 477-484. [\[CrossRef\]](#)
27. Çevikelli, T., Güven, U.M., Öztürk, A.A. (2024). Metronidazole loaded novel microemulsion formulation for topical delivery and characterization with validated new UPLC method. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(1), 111-128. [\[CrossRef\]](#)
28. Çevikelli, T., Onan, D., Güven, U.M., Demirtürk, E. (2020). Preparation, characterization and *in-vitro* evaluation of theophylline loaded microemulsion formulations. *Journal of Pharmaceutical Technology*, 1(1), 7-12. [\[CrossRef\]](#)
29. Jacob, S.E., Scheman, A., McGowan, M.A. (2018). Propylene glycol. *Dermatitis*, 29(1), 3-5. [\[CrossRef\]](#)
30. Fiume, M.M., Bergfeld, W.F., Belsito, D.V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., Liebler, D., Marks, J.G., Shank, R.C., Slaga, T.J., Snyder, P.W., Andersen, F.A. (2012). Safety assessment of propylene glycol, tripropylene glycol, and PPGs as used in cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 31(5), 245S-260S. [\[CrossRef\]](#)
31. Foo, K.S., Bavoh, C.B., Lal, B., Mohd Shariff, A. (2020). Rheology impact of various hydrophilic-hydrophobic balance (HLB) index non-ionic surfactants on cyclopentane hydrates. *Molecules*, 25(16), 3725. [\[CrossRef\]](#)

32. Lohani, A., Verma, A., Hema, G., Pathak, K. (2021). Topical delivery of geranium/calendula essential oil-entrapped ethanolic lipid vesicular emulgel to combat skin aging. *BioMed Research International*, 2021(1), 4593759. [[CrossRef](#)]
33. Simões, A., Miranda, M., Cardoso, C., Veiga, F., Vitorino, C. (2020). Rheology by design: A regulatory tutorial for analytical method validation. *Pharmaceutics*, 12(9), 820. [[CrossRef](#)]
34. Derwin, R., Patton, D., Avsar, P., Strapp, H., Moore, Z. (2022). The impact of topical agents and dressing on pH and temperature on wound healing: A systematic, narrative review. *International Wound Journal*, 19(6), 1397-1408. [[CrossRef](#)]
35. Mancini, G., Gonçalves, L.M., Marto, J., Carvalho, F.A., Simões, S., Ribeiro, H.M., Almeida, A.J. (2021). Increased therapeutic efficacy of SLN containing etofenamate and ibuprofen in topical treatment of inflammation. *Pharmaceutics*, 13(3), 328. [[CrossRef](#)]
36. Çağlar, E.Ş., Güven, G.K., Okur, N.Ü. (2023). Preparation and characterization of carbopol based hydrogels containing dexpanthenol. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 47(3), 770-783. [[CrossRef](#)]
37. Namjoshi, S., Dabbaghi M., Roberts, M.S., Grice, J.E., Mohammed, Y. (2020). Quality by design: Development of the quality target product profile (QTPP) for semisolid topical products. *Pharmaceutics*, 12(3), 287. [[CrossRef](#)]
38. Calixto, L.S., Infante, V.H.P., Maia Campos, P.M. (2018). Design and characterization of topical formulations: Correlations between instrumental and sensorial measurements. *AAPS PharmSciTech*, 19, 1512-1519. [[CrossRef](#)]
39. Mehta, S., Kaur G., Bhasin, K. (2010). Tween-embedded microemulsions-physicochemical and spectroscopic analysis for antitubercular drugs. *AAPS PharmSciTech*, 11, 143-153. [[CrossRef](#)]
40. Yılmaz Usta, D., Teksin, Z.S., Tugcu Demiroz, F. (2024). Evaluation of emulgel and nanostructured lipid carrier-based gel formulations for transdermal administration of ibuprofen: Characterization, mechanical properties, and *ex-vivo* skin permeation. *AAPS PharmSciTech*, 25(5), 124. [[CrossRef](#)]
41. Trinh, K.T., Glasgow, S. (2012). On the texture profile analysis test. in *Proceedings of the Chemeca*. Chemeca Wellington, New Zealand.
42. Owczarż, P., Rył, A., Wichłacz, Ż. (2019). Application of texture profile analysis to investigate the mechanical properties of thermosensitive injectable chitosan hydrogels. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, (24), 151-163. [[CrossRef](#)]
43. Okur, N.Ü., Yozgatlı V., Şenyiğit Z. (2020). Formulation and detailed characterization of voriconazole loaded *in situ* gels for ocular application. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44(1), 33-49. [[CrossRef](#)]
44. Bu, Y., Pandit, A. (2022). Cohesion mechanisms for bioadhesives. *Bioactive Materials*, 13, 105-118. [[CrossRef](#)]



REGIOISOMERIC N-ALKYLATION OF SOME INDAZOLES

BAZI İNDAZOLLERİN REGİOİZOMERİK N-ALKİLASYONU

Fatima DOĞANC¹ , Hakan GÖKER^{1*} 

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

ABSTRACT

Objective: Indazole scaffold have two interconvertible tautomeric forms. Based on our previous studies, regioisomeric N-alkylation of some indazole analogs was synthesized in this study and their structures were elucidated by 2D NMR methods.

Material and Method: Regioisomers were resolved for N-benzylations and alkylation of some non-substituted and substituted indazoles, under basic conditions (K_2CO_3) in DMF.

Result and Discussion: It was observed that, their occurrence ratios of N1 : N2 is almost equal (50%). Their structures were established by combination of ¹H-¹H NOE (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy, NOESY) and HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) NMR methods.

Keywords: HMBC, indazole (1,2-benzodiazole), NOESY, regioisomers

ÖZ

Amaç: İndazol halkası iki tautomerik forma sahiptir. Önceki çalışmalarımızda yola çıkarak, bu çalışmada bazı indazol analoglarının regioizomerik N-alkilasyonu sentezlendi ve yapıları 2D NMR yöntemleriyle aydınlatıldı.

Gereç ve Yöntem: Bazı non-süstitüe ve süstitüe indazollerin, DMF içinde bazik koşullar (K_2CO_3) altında N-alkilasyonu yoluyla regioizomerik N-alkilasyon türevleri elde edildi.

Sonuç ve Tartışma: N1 : N2 oluşum oranlarının neredeyse eşit olduğu (%50) gözlemlendi. Moleküllerin yapıları, ¹H-¹H NOE (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy, NOESY) ve HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) NMR yöntemleri ile aydınlatıldı.

Anahtar Kelimeler: HMBC, indazol (1,2-benzodiazol), NOESY, regioizomer

INTRODUCTION

Indazoles are a significant class of heterocyclic compounds with a diverse range of biological and pharmaceutical applications. Indazole derivatives play a crucial role in pharmacology as they form the core structure of various drug molecules, including Granisetron, a 5HT₃ receptor antagonist used as an antiemetic in cancer chemotherapy, Benzydamine, an anti-inflammatory agent, and the anti-cancer drug Pazopanib [1,2]. Indazoles are bearing a bicyclic ring structure made up of a pyrazole and a benzene ring. Indazole may exist in two tautomeric forms resulting from the transfer of a proton between the two nitrogen atoms, a process described as prototropic annular tautomerism (Figure 1). Studies on molecular refractivity indicate that non-substituted indazole predominantly exists as the 1H-tautomer (I). Research has shown that the 1H form is generally more stable than the 2H form in both gas-phase solutions and solid-state derivatives [3,4]. However, Alkorta and Elguero demonstrated through theoretical

* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Hakan Göker
e-mail / e-posta: goker@ankara.edu.tr, Phone / Tel.: +903122033013

calculations that in certain instances, the 2*H*-tautomer is more stable than the 1*H*-tautomer [5].

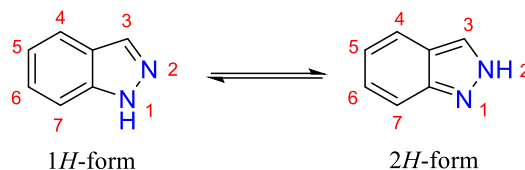


Figure 1. Annular prototropic tautomerism of indazole

The relocation is completely lost when the hydrogen on the pyrazole is replaced with any alkyl groups in indazoles.

In our recently published papers, we have characterized the occurrence and structures of some regioisomers of imidazopyrimidines, imidazopyridines, imidazopyrazines, benzimidazoles and indazoles [6-10]. For this purpose, we used advance 2D-NMR techniques for the structural elucidation. In continuation of these works, we now report, substituted indazole with some alkyl halids, for investigation of the possible regioisomers.

MATERIAL AND METHOD

Uncorrected melting points were measured on an Büchi B-540 capillary melting point apparatus. ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectra were recorded employing BRUKER AVANCE NEO 500 MHz FT spectrometer, chemical shifts (δ) are in ppm relative to TMS. The samples (5-10 mg) were prepared in 0.75 ml of CDCl_3 . The liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) spectra were taken on a Waters Micromass ZQ connected with Waters Alliance HPLC (Waters Corporation), using the ESI (+) method with a C-18 column (XTerra®, 4.6 X 250 mm, 5 μm).

6-Fluoro-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-indazole (**Ia**) and 6-Fluoro-2-(4-methoxybenzyl)-2*H*-indazole (**Ib**)

K_2CO_3 (0.152 g, 1.1 mmol) was added to a suspension of the 6-fluoro-1*H*-indazole (0.136 g, 1 mmol) in DMF (1 ml) and stirred. One hour later, 4-methoxybenzyl chloride (0.172 g, 1.1 mmol) was added. After overnight stirring at room temperature, water was added and oily precipitate was separated. Crude product was purified by column chromatography.

Purification (EtOAc : *n*-Hexane 10 : 100) first afforded the compound **Ia**, yield 0.066 g, 25.8%, mp : 52-54°C. $^1\text{H-NMR}$ δ ppm (CDCl_3) : 3.79 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.49 (s, 2H, $N-\text{CH}_2$), 6.85-6.87 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, H-3',5'), 6.9-6.94 (m, 1H, H-5), 7.00 (broad d, 1H, $J = 9.2$ Hz, H-7), 7.18-7.20 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, H-2',6'), 7.66-7.69 (m, 1H, H-4), 8.02 (s, 1H, H-3) ; **COSY** : [H-2',6' / H-3',5'], [H-5 / H-4] ; **NOESY** : [N- CH_2 / H-7], [N- CH_2 / H-2',6'], [OCH_3 / H-3',5'] ; $^{13}\text{C-NMR}$, **HSQC** & **HMBC** δ ppm (CDCl_3) : 162.1 (d, $J = 242$ Hz, C-6), 159.32 (C-4'), 139.69 (d, $J = 12.5$ Hz, C-7a), 133.48 (C-3), 128.67 (C-2',6'), 128.47 (C-1'), 122.5 (d, $J = 11$ Hz, C-4), 121.27 (C-3a), 114.2 (C-3',5'), 110.6 (d, $J = 25.9$ Hz, C-5), 95.1 (d, $J = 26$ Hz, C-7), 55.26 ($-\text{OCH}_3$), 52.73 (N- CH_2) ; **MS** (ESI+) m/z : 257 (M+H, 44%), 121 (M+H, 100%), $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{O}$.

Continued elution with (EtOAc : *n*-Hexane 12 : 100) provided **Ib**, yield 0.062 g, 24.2%, mp : 84-87°C. $^1\text{H-NMR}$ δ ppm (CDCl_3) : 3.81 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.51 (s, 2H, $N-\text{CH}_2$), 6.87-6.89 (m, 1H, H-5), 6.91 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, H-3',5'), 7.27 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, H-2',6'), 7.32 (dd, 1H, $J = 10.1$ & 2.1 Hz, H-7), 7.58 (dd, 1H, $J = 9.1$ & 5.4 Hz, H-4), 7.85 (s, 1H, H-3) ; **COSY** : [H-2',6' / H-3',5'], [H-5 / H-4] ; **NOESY** : [N- CH_2 / H-3], [N- CH_2 / H-2',6'], [OCH_3 / H-3',5'] ; $^{13}\text{C-NMR}$, **HSQC** & **HMBC** δ ppm (CDCl_3) : 161.6 (d, $J = 241$ Hz, C-6), 159.8 (C-4'), 148.6 (d, $J = 13.7$ Hz, C-7a), 129.7 (C-2',6'), 127.4 (C-1'), 123 (C-3), 121.85 (d, $J = 10.4$ Hz, C-4), 119.19 (C-3a), 114.6 (C-3',5'), 113.2 (d, $J = 28$ Hz, C-5), 100.7 (d, $J = 23.6$ Hz, C-7), 57.09 (N- CH_2), 55.32 (OCH_3) ; **MS** (ESI+) m/z : 257 (M+H, 55%), 121 (M+H, 100%), $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{O}$.

Methyl 1-(4-*tert*-butylbenzyl)-1*H*-indazole-5-carboxylate (IIa) and Methyl 2-(4-*tert*-butylbenzyl)-2*H*-indazole-5-carboxylate (IIb)

K₂CO₃ (0.152 g, 1.1 mmol) was added to a suspension of methyl 1*H*-indazole-5-carboxylate (0.176g, 1 mmol) in DMF (1 ml) and stirred. One hour later, 4-*tert*-butylbenzyl bromide (0.25 g, 1.1 mmol) was added. After overnight stirring at room temperature, water was added and precipitate was filtered. Crude product was purified by column chromatography.

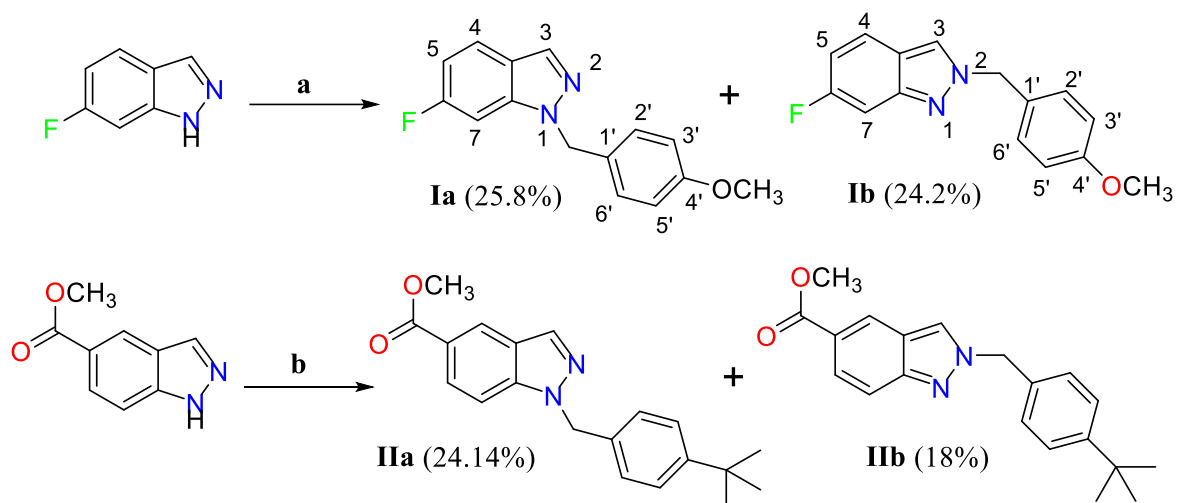
Purification (EtOAc : *n*-Hexane 12 : 100) first afforded the compound **IIa**, yield 0.078 g, 24.14%, mp : 130-132°C. ¹H-NMR δ ppm (CDCl₃) : 1.29 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 3.96 (s, 3H, -OCH₃), 5.60 (s, 2H, *N*-CH₂), 7.17 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H-2',6'), 7.34 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H-3',5'), 7.41 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H-7), 8.04 (dd, 1H, *J* = 8.85 & 1.5 Hz, H-6), 8.16 (d, 1H, *J* = 0.85 Hz, H-3), 8.54 (s, 1H, H-4) ; COSY : [H-2',6' / H-3',5'], [H-6 / H-7] ; NOESY : [N-CH₂/H-7], [N-CH₂/H-2',6'], [-C(CH₃)₃/H-3',5'] ; ¹³C-NMR, HSQC & HMBC δ ppm (CDCl₃) : 167.27 (C=O), 150.97 (C-4'), 141.3 (C-7a), 135.03 (C-4), 133.3 (C-1'), 127.2 (C-6), 127.02 (C-2',6'), 125.76 (C-3',5'), 124.7 (C-3), 124.05 (C-3a), 123.0 (C-5), 109.12 (C-7), 52.87 (*N*-CH₂), 52.09 (-OCH₃), 34.53 (-C(CH₃)₃), 31.27 (-C(CH₃)₃) ; MS (ESI+) *m/z* : 323 (M+H, 100%), 147 (M+H, 54%), C₂₀H₂₂N₂O₂.

Continued elution with (EtOAc : *n*-Hexane 15 : 100) provided **IIb**, yield 0.058 g, 18%, mp : 147-150°C. ¹H-NMR δ ppm (CDCl₃) : 1.32 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 3.94 (s,3H, -OCH₃), 5.59 (s, 2H, *N*-CH₂), 7.27 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, H-2',6'), 7.41 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H-3',5'), 7.74 (d, 1H, *J* = 9.15 Hz, H-7), 7.91 (dd, 1H, *J* = 9.15 & 1.55 Hz, H-6), 8.04 (s, 1H, H-3), 8.54 (s, 1H, H-4) ; COSY : [H-2',6' / H-3',5'], [H-6 / H-7] ; NOESY : [N-CH₂ / H-3], [N-CH₂ / H-2',6'], [-C(CH₃)₃ / H-3',5'] ; ¹³C-NMR, HSQC & HMBC δ ppm (CDCl₃) : 167.5 (C=O), 151.76 (C-4'), 150.2 (C-7a), 132.1 (C-1'), 128 (C-2',6'), 126 (C-3',5'), 125.8 (C-6), 125.25 (C-3), 124.9 (C-4), 123.8 (C-3a), 121.4 (C-5), 117.4 (C-7), 57.54 (*N*-CH₂), 52.03 (-OCH₃), 34.64 (-C(CH₃)₃), 31.27 (-C(CH₃)₃) ; MS (ESI+) *m/z* : 323 (M+H, 100%), 147 (M+H, 74%), C₂₀H₂₂N₂O₂.

RESULT AND DISCUSSION

Targeted compounds were prepared using the methods outlined in Scheme 1. Alkylation of pyrazoles are region-specific, many times the mixtures of two isomers are obtained with same or different ratio [11]. In this study, when we attempted alkylation of indazoles with alkyl halides under basic conditions (K₂CO₃, in DMF), alkylation was formed *N*¹ and *N*² positions, so regioisomers (**Ia**, **IIa** as *N1*) and (**Ib**, **IIb** as *N2*) series were obtained.

In our experiments the occurring ratio of regioisomers were highly close to each other as expected (Scheme 1). While it was almost equal in the **I** series, the formation of **IIb** was occurred to a slightly lesser extent in the **II** series. One of the most decisive method 2D NOESY experiment has been used for the structure elucidation of the regioisomers firstly. Very strong NOE enhancements have been seen between *benzylic protons* and H-7 in the NOESY spectra of **Ia** and **IIa** (Figure 2). However, for the **b** series of the same compounds since there is no enough proximity between *N*-CH₂ and H-7, NOE enhancements were not observed as expected. In the spectra of **Ib** and **IIb** strong NOE interaction were seen between the *benzylic protons* and H-3 (Figure 2). These results were also supported by their HMBC correlations. It is possible to see the interactions of *benzylic protons* with C-7a in the HMBC spectra of **Ia** and **IIa** (Figure 3). In contrast, in the HMBC spectrum of **Ib** and **IIb** the interactions of *benzylic protons* with C-3 were seen (Figure 3).



Reagents: a) Anhydrous potassium carbonate / 4-methoxybenzyl chloride
b) Anhydrous potassium carbonate / 4-*tert*-butylbenzyl bromide

Scheme 1. Synthesis of new regioisomeric indazole analogues

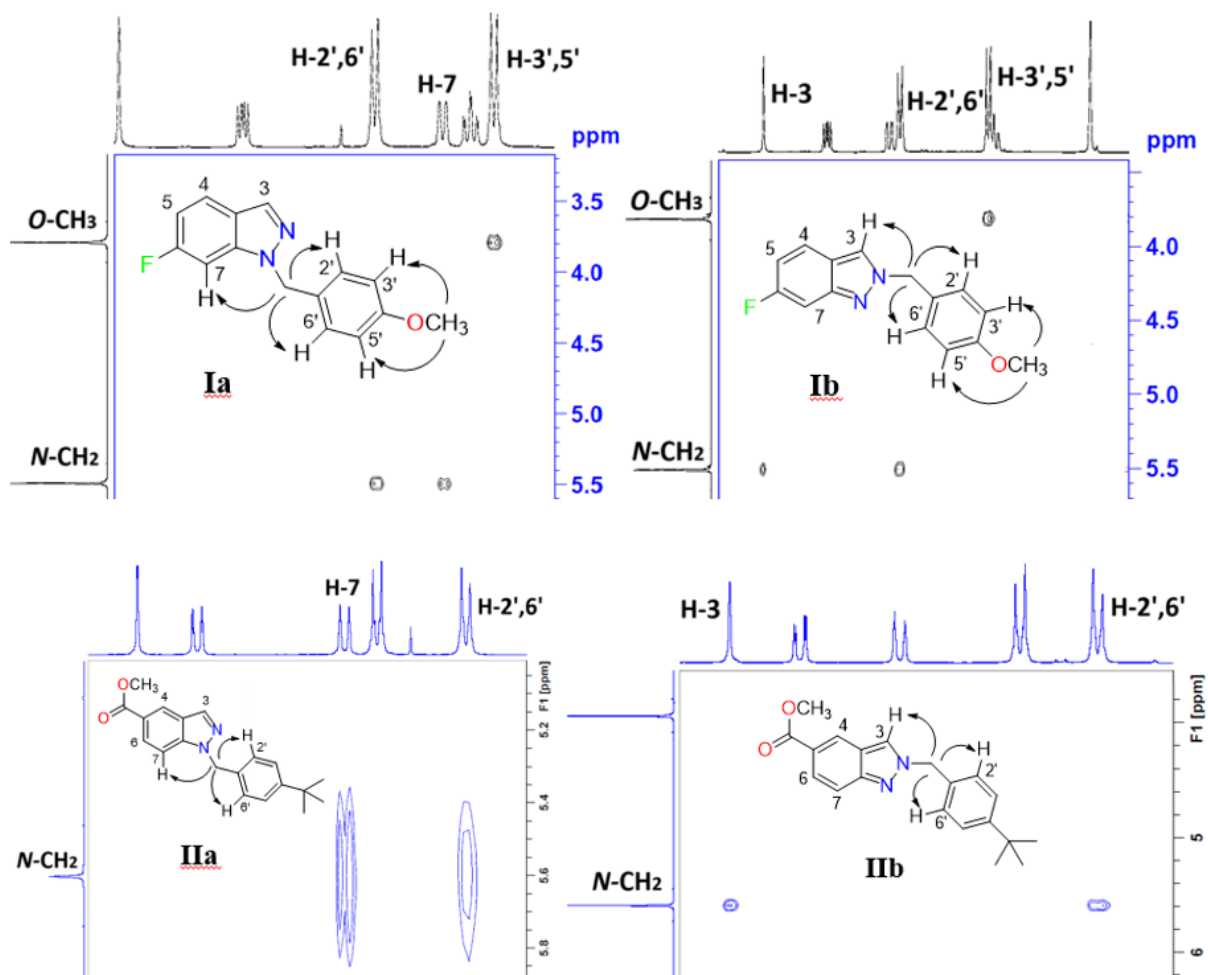


Figure 2. Partial NOESY spectra of compounds **Ia-b** and **IIa-b**

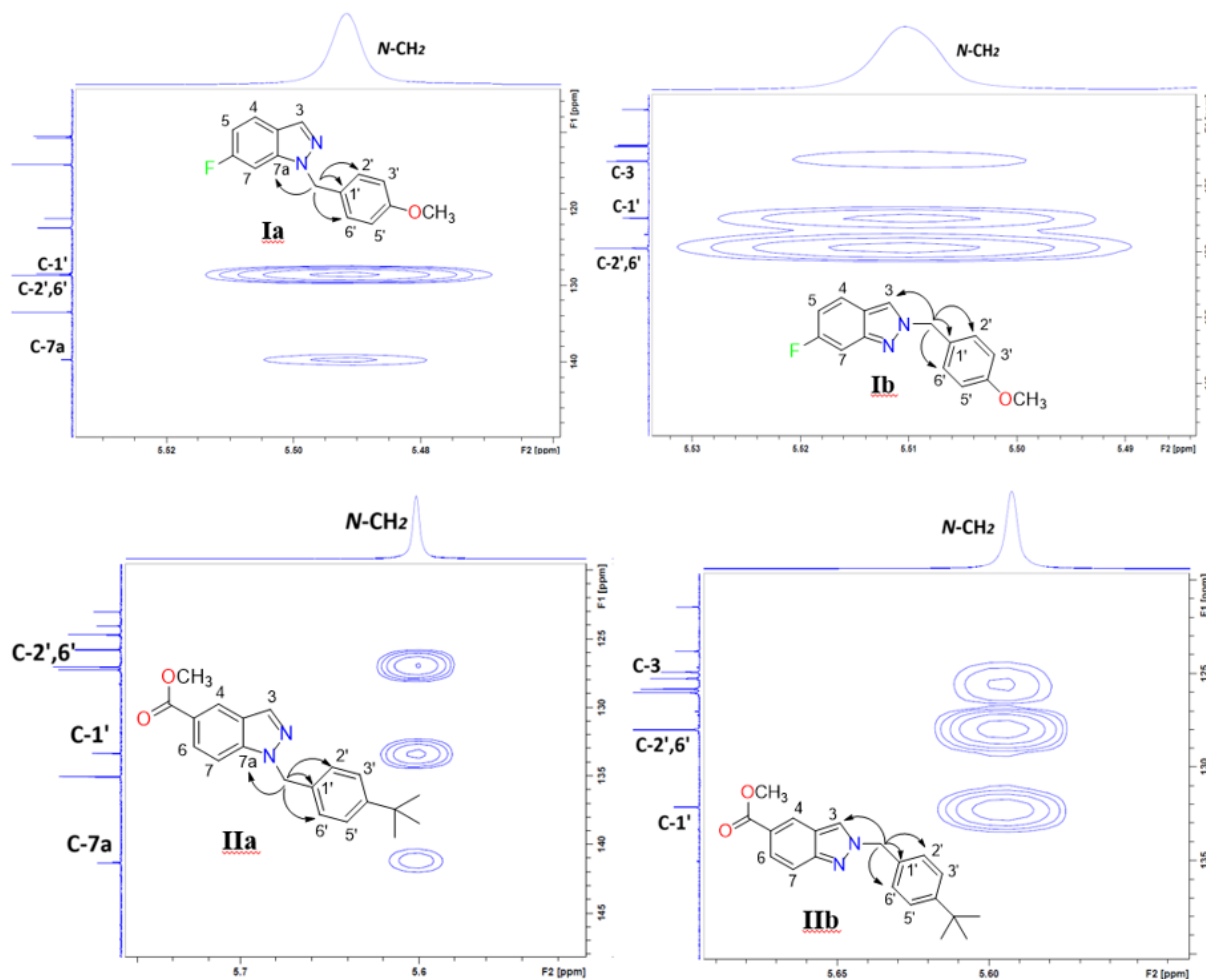


Figure 3. Partial HMBC spectra of compounds **Ia-b** and **IIa-b**

Conclusions

The alkylation of 1*H*- and 2*H* tautomeric forms of indazoles have been used to develop new active pharmaceutical ingredients. Hence their regioisomeric *N*-alkylation of these molecules would be of great importance to the pharmaceutical industry. It was found that *N*-alkylation of indazoles was realized with almost equal ratio (50%) in presence of anhydrous K_2CO_3 in DMF. NOESY and HMBC experiments were the decisive NMR techniques for structural elucidation of these types of regioisomers. The complete structure elucidation of all synthesized compounds was performed using 1D and 2D NMR experiments including COSY, NOESY, gHSQC and gHMBC.

ACKNOWLEDGEMENTS

Central Laboratory of Pharmacy, Faculty of Ankara University provided support for acquisition of NMR and mass spectrometer used in this work.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: H.G.; Design: F.D., H.G.; Control: F.D., H.G.; Sources: F.D., H.G.; Materials: F.D., H.G.; Data Collection and/or Processing: F.D., H.G.; Analysis and/or Interpretation: F.D., H.G.; Literature Review: F.D., H.G.; Manuscript Writing: H.G.; Critical Review: F.D., H.G.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

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

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

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

REFERENCES

1. Gaikwad, D.D., Chapolikar, A.D., Devkate, C.G., Warad, K.D., Tayade, A.P., Pawar, R.P., Domb, A.J. (2015) Synthesis of indazole motifs and their medicinal importance: An overview. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 90, 707-731. [\[CrossRef\]](#)
2. Alam, R.M., Keating, J.J. (2021). Regioselective *N*-alkylation of the 1*H*-indazole scaffold; ring substituent and *N*-alkylating reagent effects on regioisomeric distribution. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 17, 1939-1951. [\[CrossRef\]](#)
3. Uriarte, I., Reviriego, F., Calabrese, C., Elguero, J., Kisiel, Z., Alkorta, I.E., Cocinero, E.J. (2019). Bond length alternation observed experimentally: The case of 1*H*-indazole. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 25, 10172. [\[CrossRef\]](#)
4. Hunt, K.W., Moreno, D.A., Suiter, N., Clark, C.T., Kim, G. (2009). Selective synthesis of 1-functionalized-alkyl-1*H*-indazoles. *Organic Letters* 11(21), 5054-5057. [\[CrossRef\]](#)
5. Alkorta, I., Elguero, J. (2005). Theoretical estimation of the annular tautomerism of indazoles. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 18, 719-724. [\[CrossRef\]](#)
6. Doganc, F., Göker, H. (2024). Differentiation of regioisomeric *N*-alkylation of some indazoles and pyrazolopyridines by advanced NMR techniques. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 62, 765-774. [\[CrossRef\]](#)
7. Doganc, F., Aydin, A.S., Şahin, E., Göker, H. (2020). Regioselective *N*-alkylation of some 2 or 6-chlorinated purine analogues. *Journal of Molecular Structure*, 1272, 134200. [\[CrossRef\]](#)
8. Puskullu, M.O., Doganc, F., Ozden, S., Sahin, E., Celik, I., Göker, H. (2021). Synthesis, NMR, X-ray crystallography and DFT studies of some regioisomers possessing imidazole heterocycles. *Journal of Molecular Structure*, 1243, 130811. [\[CrossRef\]](#)
9. Karaaslan, C., Doganc, F., Alp, M., Koc, A., Karabay, A.Z., Göker, H. (2020). Regioselective *N*-alkylation of some imidazole-containing heterocycles and their *in vitro* anticancer evaluation. *Journal of Molecular Structure*, 1205, 127673. [\[CrossRef\]](#)
10. Göker, H., Özden, S. (2019). Regioselective *N*-alkylation of 2-(3,4-dimethoxyphenyl)imidazo[4,5-*b*] and [4,5-*c*]pyridine oxide derivatives: Synthesis and structure elucidation by NMR. *Journal of Molecular Structure*, 1197, 183-195. [\[CrossRef\]](#)
11. Bulygina, L.A., Khrushcheva, N.S., Klemenkova, Z.S., Lyssenko, K.A., Peregodov, A.S., Solokov, V.I. (2018). *Journal of Organometallic Chemistry*, 867, 391-397. [\[CrossRef\]](#)



YAŞLILARDA AKILCI İLAÇ KULLANIMINDA ECZACI SORUMLULUĞU

PHARMACIST RESPONSIBILITY FOR RATIONAL MEDICATION USE IN THE ELDERLY

Yağmur ÖZKAYA^{1*} , Gülbin ÖZÇELİKAY² 

¹Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık İşletmeciliği Anabilim Dalı, 24100, Erzincan, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık İşletmeciliği Anabilim Dalı, 06560, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'nin de nüfusu, sağlık alanındaki gelişmeler ve doğum oranlarının azalması sonucunda giderek yaşlanmaktadır. Yaşlı bireylerin sayısının toplum içinde giderek artması ile birlikte sağlık alanında farklı sorunlar ortaya çıkmıştır. Bu araştırma, yaşlı bireylerin reçete edilen ilaçların kullanımı hakkında sahip oldukları bilgi düzeylerini saptamak ve eczacılar tarafından uygulanan ilaç eğitim programının ilaç bilgi düzeylerine etkisini incelemek amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Araştırmanın materyalini, Ankara ilinde bulunan, 3 farklı huzurevinde yaşayan sürekli ilaç kullanmakta olan ve ilaçlarını kendisi alan 65 yaş ve üzeri 62 bireye uygulanan anket formları oluşturmaktadır. Demografik bilgiler, hastalık ve ilaç bilgisi, ilaç kullanımında eczacının rolü ile ilgili olmak üzere üç bölümden oluşan anket formu araştırmacılar tarafından uzman görüşü alınarak ve pilot çalışmalar sonucunda geliştirilerek hazırlanmıştır. Anket formu ve ilaç bilgi formu ön test olarak 62 hastaya uygulanmıştır. Daha sonra hastalara, Farmakolog eczacı tarafından akılcı ilaç kullanımı ile ilgili eğitim verilmiştir. Eğitim, teorik bilgi ve bire bir danışmanlık şeklinde tasarlanmıştır. Eğitim sonrası yine aynı anket formu uygulanarak son test gerçekleştirilmiştir. İlk ve son test sonuçları SPSS ver. 23.0 programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: İlaçlarını kendi kendine alabilen yaşlı hastalara verilen eğitim sonrasında, kullandıkları ilacın adı, ilacın kullanılma amacı, dozu, yan etkileri, saklama koşulları, son kullanma tarihlerinin kontrol edilmesi gerektiği, ilaç-besin etkileşimlerinin neler olduğu gibi konulardaki bilgi düzeyleri arasında ön test ve son test puanları karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlemlenmiştir. Sonuç olarak; 65 yaş üstü yaşlı bireylerin, ilaçlarını akılcı kullanmaları konusunda eczacı yönetimli ilaç eğitim programlarının uygulanmasının yarar sağladığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Akılcı ilaç kullanımı, eczacı, ilaç eğitimi, yaşlı hastalar

ABSTRACT

Objective: The population is gradually aging in Turkey, as in the rest of the world, as a result of developments in the field of health and declining birth rates. With the increase in the number of elderly individuals in the society, different problems have emerged in the field of health. This study was conducted to determine the level of knowledge of elderly individuals regarding the use of prescribed drugs and to examine the effect of the drug education program implemented by pharmacists on the level of drug knowledge.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Yağmur Özkaya
e-posta / e-mail: ykilicdagi@erzincan.edu.tr, Tel. / Phone: +904462245344

Gönderilme / Submitted : 22.08.2024

Kabul / Accepted : 17.11.2024

Yayınlanma / Published : 20.01.2025

Material and Method: *The material of the study consisted of questionnaire forms administered to 62 individuals aged 65 years and over who were continuously taking medication and taking their own medication in 3 different nursing homes in Ankara province. The questionnaire form consisting of three sections including demographic information, disease and drug information, and the role of the pharmacist in drug use was prepared by the researchers by reviewing the literature. The questionnaire form and drug information form were applied to 62 patients as a pre-test. Afterwards, the patients were given training on rational drug use by a pharmacologist faculty member. The training was designed as theoretical information and one-to-one counseling. After the training, the same questionnaire form was applied and the post-test was performed. Initial and post-test results were evaluated using SPSS ver. 23.0 program was used.*

Result and Discussion: *There was a significant difference between the pre-test and post-test scores of the elderly patients who were able to take their medications on the subjects such as the name of the medication, the purpose of the medication, dosage, side effects, storage conditions, the need to check expiration dates, and drug-nutrient interactions. In conclusion, it was observed that the implementation of pharmacist-led drug education programs was beneficial for elderly individuals over 65 years of age to use their medications rationally.*

Keywords: *Elderly patients, drug education, pharmacist, rational drug use*

GİRİŞ

Yaşamın olağan akışı içerisinde bir gelişim evresi olan yaşlılık, bireylerin artan sağlık sorunları ve bakım ihtiyaçlarından dolayı özel bakım ve tıbbi desteğe en çok ihtiyaç duyulan dönemi olarak karşımıza çıkmaktadır [1]. Nüfus yaşlanmasının hızı geçmişe göre çok daha fazladır [2,3]. Son yapılan araştırmalar, ülkemizin nüfus yapısında köklü değişimlerin yaşandığını göstermektedir [4,5]. Yaşlanmayla birlikte kronik hastalık görülme sıklığı artmakta ve buna bağlı olarak ortaya çıkan fizyolojik değişiklikler bir takım sorunları beraberinde getirmektedir [6]. Bu sorunlardan birisi de yaşlılarda ilaç kullanımınıdır [7]. Yaşlanma sürecinde algısal süreçlerin yavaşlaması ve düşünme yeteneğinin zayıflaması gibi değişimler yaşam sürecini etkilemektedir. Bu değişimler özellikle kronik hastalıkların tedavisinde ilaç kullanımını da etkilemektedir. Yaşlı hastalar, nüfusun büyük bir kısmını oluşturmasalar da yaşadıkları toplumda en çok ilaç kullanan grup haline gelmektedir. ABD'de yapılan kapsamlı bir ilaç kullanım araştırmasında, 65 yaş üzeri kadınlarda polifarmasi prevalansının oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir [8].

Yaşlı bireylerde reçeteli ilaçların yanı sıra reçetesiz ilaçlar ve tamamlayıcı tıp uygulamalarının sık kullanımı, ilaç etkileşimleri ve yan etkiler riskini artırmaktadır [7]. Gereğinden fazla ilacın reçetelenmesi, hasta için kabul edilemez yan etkilere sahip ilaçların reçete edilmesi, zarar verebilecek ilaç-ilaç ve ilaç-hastalık etkileşimlerine sahip ilaçların aynı anda reçete edilmesi vb. birçok nedenden ötürü polifarmasi uygunsuz olabilmektedir [9,10]. Yapılan çalışmalarda, alınan ilaçların sayısı ile yan etkilerinin sıklığı arasında doğrusal bir ilişki bulunduğu belirtilmiştir. İlaç yan etkileri, kalp yetmezliği meme kanseri, hipertansiyon ve pnömoniden sonra önlenebilir ciddi sağlık sorunları arasında yer almaktadır [11]. Yapılan birçok çalışmada ülkemizdeki yaşlıların da diğer ülkelerdeki yaşlılara benzer şekilde yoğun bir biçimde ilaç tükettikleri saptanmıştır [12]. Yaşlı hastaların kognitif ve fonksiyonel kapasitesinin azalması, ilaç hakkındaki bilgisi, beklentileri ve tatmin düzeyi, doktor ve eczacı ile iletişimi ilaca uyum sorunlarını doğurabilmektedir. Bu gibi durumların tedaviye uyumsuzluğun nedeni olabildiği birçok kaynakta belirtilmektedir [12,13].

Yaşlı hastaların ilaç bilgilerini hatırlama güçlüğü ve karar verme becerilerindeki azalmalar, ilaçların yanlış dozda kullanılması ve tamamen unutulmasına yol açmaktadır [14,15,16]. Hastaneye yatan yaşlı hastaların yaklaşık % 33'ünde ilaçların istenmeyen yan etkilerinin olduğu bildirilmiştir [17]. Akıcı'nın yapmış olduğu meta-analiz çalışmasında ve McCormack ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada yaşlı hastaların ilaçları konusunda yeterince bilgilendirilmedikleri bildirilmiştir. Eski ve Pınar'ın yapmış olduğu çalışmada hastaların %62.5'ine, Akıcı ve arkadaşlarının çalışmasında %77'sine ilaçları hakkında hiç bilgi verilmediği saptanmıştır [18,19,20,21].

Akılcı ilaç kullanımı; ilaçların hastanın fizyolojik özelliklerine ve ihtiyaçlarına yönelik en etkin ve güvenli bir şekilde kullanılmasını prensiplerine dayanmaktadır. Akılcı ilaç kullanımı sürecinde eczacılar, ilaç tedavisinin tüm aşamalarında aktif rol alarak hastaların tedaviye uyumlarını artırmaktadır

[22]. Bir hastanın farmakoterapötik sürecinde, tanı ve tedavi planlaması hekim tarafından gerçekleştirilirken tedavinin güvenli ve etkili bir şekilde uygulanmasında eczacılar önemli bir role sahiptir. Özellikle kamu kurumlarında ilacı yazan hekimin hasta başına ayırabildiği zaman, sadece muayene ve ilaç yazmasına yetmektedir [23]. Eczacılar akılcı ilaç kullanımı doğrultusunda en detaylı bilgiyi sunan önemli bilgi kaynaklarından birisidir. Eczacı, tedavi ile hasta arasındaki son basamağı oluşturmaktadır. İlaçla tedavi sürecinde, hastanın ilaçlara uyumu, eczacının sağladığı bilgi ve danışmanlık hizmetleri ile doğrudan ilişkilidir [24]. İlaç tedavisinin devamlılığı sürecinde, hasta ile eczacı arasındaki etkileşim, tedavi etkinliğinin artırılması ve güvenliğin sağlanması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle özellikle serbest eczacılar, tüm dünyada sağlık sisteminin temel unsurlarından biridir. Advers etki ortaya çıktığında ulaşım kolaylığının yanı sıra eczacının danışmanlık ücreti almaksızın tavsiye de bulunması nedeniyle hastaların çoğunlukla ilk danıştıkları yer eczaneler olmaktadır. Eczacının doğru yönlendirmelerde bulunması bu açıdan çok önemlidir. Bu şartların sağlanmaması hastanın tedaviden alacağı azami yararı engellemek dışında, hastanın zarar görmesine de yol açabilmektedir. Önemli bir diğer yönü ise; yaşlı hastalarda gereksiz ilaç kullanımı, artan maliyet dolayısıyla sağlık sistemine büyük bir mali yük oluşturmaktadır [25].

Dolayısıyla akılcı ilaç kullanımı konusunda iyileştirme için en önemli görev serbest eczacılara düşmektedir. Yaşlı bireylerin reçete edilen ilaçlara uyum düzeylerinin ve bu düzeyi etkileyen faktörlerin belirlenmesi, eczacının bu konudaki rolünün değerlendirilmesi ve ilaç eğitim programlarının etkinliğinin ölçülmesi bu çalışmanın temel amaçlarından biridir. Bu araştırmanın temel amacı, eczacıların verdiği eğitimin, yaşlı bireylerin ilaçlarını doğru ve düzenli kullanmalarına olan etkisini bilimsel olarak ortaya koymaktır. Ankara'daki huzurevlerinde yaşayan bir grup üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmada, katılımcıların demografik özellikleri, sağlık durumları, ilaç kullanım alışkanlıkları ve eczacılara yönelik görüşleri detaylı olarak incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ankara il merkezindeki huzurevlerinde ikamet eden 65 yaş ve üzeri, kronik hastalığı olan ve ilaçlarını düzenli olarak kullanan bireylerin ilaç kullanımına uyumları üzerine eczacı eğitiminin etkisi incelemek amacıyla yapılan bu çalışmada yarı deneysel bir araştırma tasarımı kullanılmıştır. Araştırmanın örneklemini sürekli ilaç kullanan 62 yaşlı hasta oluşturmaktadır.

Veri Toplama Aracı

Araştırma, demografik bilgiler, sağlık durumu, ilaç kullanımı ve eczacıya yönelik tutumlar gibi farklı boyutları kapsayan bir anket ve ön test-son test değerlendirme ölçeği ile desteklenmiştir. Veri toplama aracının geliştirilmesi sürecinde literatür incelemesi, uzman görüşü ve pilot çalışmalar yapılarak katılımcıların ilaç kullanımına yönelik bilgi, tutum ve davranışlarının kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Anketin ilk bölümünde demografik bilgiler toplanırken, diğer bölümlerde sağlık durumu, ilaç kullanımı ve eczacıya yönelik görüşler detaylı olarak incelenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Veri toplama aracının içeriği

Anket Formu	İçerik	Amaç
Bölüm 1	Demografik Bilgiler	Katılımcıların genel profilini belirlemek
Bölüm 2	Sağlık Durumu ve İlaç Kullanımı	İlaç kullanımıyla ilgili detaylı bilgi almak
Bölüm 3	Toplum Eczacılarına Yönelik Görüşler	Eczacının rolünü değerlendirmek
Öntest-Sontest	İlaç Bilgi Düzeyi	Katılımcının ilaç bilgisindeki değişimi ölçmek

Yapılan Cronbach's Alpha analizi sonucunda, anketin iç tutarlılığı oldukça yüksek bulunmuştur. Elde edilen Cronbach's Alpha 0.87 değeri, anket maddelerinin birbirleriyle tutarlı bir şekilde ölçüm

yaptığını ve aynı kavramı yansıttığını göstermektedir. Bu sonuç, anketin güvenilirliği açısından olumlu bir bulgudur. Ayrıca, farklı alt boyutlar için yapılan analizlerde de Cronbach's Alpha değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu görülmüştür. Bu durum, anketin her bir alt boyutunun da güvenilir bir şekilde ölçüm yaptığını göstermektedir (Tablo 2).

Tablo 2. Veri aracının Cronbach's Alpha değerleri

Alt Boyut	Madde Sayısı	Cronbach's Alpha
Demografik Bilgiler	7	0.82
Sağlık Durumu ve İlaç Kullanımı	17	0.87
Toplum Eczacılarına Yönelik Görüşler	8	0.79

Yaşlı hastalara eczacı tarafından verilen eğitimin hastaların ilaç bilgi düzeylerine etkisini incelemek amacıyla geliştirilen 12 soruluk ön test- son test anket formunun cronbach's Alpha değerleri Tablo 3'te verilmiştir. Müdahale grubunda, ön test Cronbach alfa değeri 0.85, son test Cronbach alfa değeri ise 0.88 olarak hesaplanmıştır. Bu yüksek değerler, ölçeğin müdahale grubundaki iç tutarlılığının ve güvenilirliğinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Kontrol grubunda ise, ön testte 0.80, son testte 0.82 olarak hesaplanan Cronbach alfa değerleri ölçeğin istikrarlı ve tutarlı bir yapıda olduğunu ifade etmektedir. Genel olarak, her iki grup için de elde edilen Cronbach alfa değerleri 0.70'in üzerinde olduğundan, ölçeğin bu çalışma bağlamında geçerli ve güvenilir olduğu kabul edilmektedir.

Tablo 3. Müdahale ve kontrol gruplarına ait öntest ve sontest (Cronbach alfa) değerleri

Grup	Öntest Cronbach Alfa	Sontest Cronbach Alfa
Müdahale Grubu	0.85	0.88
Kontrol Grubu	0.80	0.82

Araştırmanın Tasarımı

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu'nun 13/06/2016 tarih ve 193 sayılı kararı ile etik kurul kararı alındıktan sonra gerçekleştirilen bu çalışmada, yaşlı bireylerin ilaç bilgilerini artırmak amacıyla tasarlanan bir eğitim programının etkinliği incelenmiştir. Eczacılar tarafından 4 hafta boyunca haftada bir kez yüze görüşmeler şeklinde tasarlanan eğitim sadece müdahale grubuna (n=30) verilmiştir. Çalışma, eğitim öncesi ilaç bilgi düzeyinin belirlenmesi, eğitim müdahalesi ve eğitim sonrasında bilgi düzeyindeki değişimi değerlendirme olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Eğitim programı, eczacılar tarafından bireysel olarak verilen dört haftalık yüz yüze görüşmelerden oluşmuştur. Eğitimde, ilaç kullanımı, yan etkiler, ilaç etkileşimleri gibi konulara yer verilmiştir. Yaşlı bireylerin ilaç bilgilerini artırmanın yanı sıra ilaç kullanımının etkinliğini ve güvenliğini de desteklemeyi amaçlayan bu eğitimde, ilaçların ne olduğu ve nasıl çalıştığı, ilaçların saklama koşulları, ilaç yan etkileri ve bunlarla nasıl başa çıkabilecekleri, ilaçlarını almayı unuttuklarında ne yapmaları gerektiği, farklı ilaçların birbirleriyle olan etkileşimleri, eczane hizmetleri ve destek kaynakları gibi konular yer almıştır. Eğitim birebir ve grup halinde verilmiş olup interaktif bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Gerekli durumlarda yaşlı hastaların ilaç ve kronik hastalıklarıyla ilgili özel soruları cevaplanmış ve ilaç kullanımıyla ilgili pratik uygulamalar yapılmıştır. Eğitim öncesi ve sonrası uygulanan ön test-son test soru formları ile katılımcıların ilaç bilgisi düzeylerindeki değişim ölçülmüştür.

Verilerin Analizi

Araştırma verileri, SPSS 23.0 istatistik paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Katılımcıların eğitim öncesi ve sonrası ilaç bilgisi düzeyleri arasındaki farkı tespit etmek için, eşleştirilmiş (bağımlı) örneklem t testi (paired samples t-test) uygulanmıştır. Bu parametrik test, aynı bireylere ait iki ölçüm arasındaki ortalama farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Araştırmaya dahil edilen 62 yaşlı hastanın yaş ortalaması 74.74 ± 6.26 'dır. Katılımcıların %56.5'i kadın, %62.9'u ilkökul mezunu ve %88.7'sinin sağlık güvencesi bulunmaktadır (Tablo 4).

Tablo 4. Sosyodemografik özelliklerine göre katılımcıların dağılımı

Cinsiyet	N	%
Kadın	35	56.5
Erkek	27	43.5
Eğitim Durumu		
Okuma Yazma Bilmeyen	11	17.7
İlkokul Mezunu	39	62.9
Ortaokul Mezunu ve Üzeri	12	19.3
Sağlık Güvencesi		
Var	55	88.7
Yok	7	11.3

Huzurevinde kalan yaşlıların kronik hastalıklarının olup olmadığı sorulduğunda %96.8'inin bir ve birden fazla kronik hastalığa sahip olduğu ve yaşlıların %79'unda hipertansiyon %41.9'unda kronik kalp yetmezliği olduğu saptanmıştır (Tablo 5).

Tablo 5. Katılımcıların teşhis edilen hastalıklara göre dağılımları

Hastalık Türü	N	%
Hipertansiyon	49	79
Osteoporoz	17	27.4
Romatizma	14	22.6
Koah	9	14.5
Diyabet	20	32.3
Kronik Kalp Yetmezliği	26	41.9
Astım	10	16.1
Anemi	8	12.9
Ülser	8	12.9
Diğer	21	33.9

Katılımcıların devamlı kullandıkları ilaçlar sorulduğunda %32.3'ünün 4 ve/veya 5 ilaç kullandığı, %40.3'ünün 2 ve/veya 3 ilaç kullandığı saptanmıştır (Tablo 6). Katılımcıların ilaç kullanım süreleri değerlendirildiğinde, %46.8'inin ilaçlarını 4 ve 5 yıl süresince kullandığı belirlenmiştir (Tablo 7).

Tablo 6. Katılımcıların devamlı kullandıkları ilaç sayısı dağılımları

Devamlı Kullanılan İlaç Sayısı	N	%
En az 1 ilaç	4	6.5
2 ve 3 ilaç	25	40.3
4-5 ilaç	20	32.3
6-7 ilaç	9	14.5
Daha fazla	4	6.5

Tablo 7. Katılımcıların ilaç kullanma sürelerinin dağılımları

İlaç Kullanım Süresi	N	%
1 Yıl	4	6.5
2-3 Yıl	17	27.4
4-5 Yıl	29	46.8
Daha Fazla	12	19.4

Yaşlıların ilaç kullanımıyla ilgili bilgi edinme durumları incelendiğinde, %72.6'sının ilaçları hakkında bilgi aldığı ve bu bilginin %56.5'inin hekimden, %19.4'ünün ise eczacıdan sağladığı ortaya çıkmıştır. Yaşlıların %83.9'u ilaçları kullanmayı zaman zaman unuttuğu belirterek unutmaya nedenlerini unutkanlık, dikkatsizlik, ilaç sayısının fazla olması olarak tanımlamışlardır. Yaşlılara ilaçların yan etkileri sorulduğunda %71'inin kullandıkları ilaçlarla ilgili yan etki geliştiğinin ve bu yan etkiler sonucunda %43.5'inin doktora gittiği saptanmıştır.

Yaşlıların hastaların hastalıklarından dolayı kontrole gitme durumlarına bakıldığında ise; %51.6'sının şikâyeti oldukça gittiğinin, %17.7'sinin gitmediği ilaçları bittikçe reçete yazdığını saptanmıştır. Yaşlıların hekimin reçete ettiği ilaçlar dışında ilaç kullanıp kullanmadıkları incelendiğinde, %56.5'inin hekimin verdiği ilaçlar dışında analjezikler ve antibiyotikler gibi ilaçlar kullandığı belirlenmiştir. Yaşlıların bitkisel ürün kullanımı hakkında yapılan değerlendirmede, %24.2'sinin bitkisel ürün kullandığı saptanmıştır. Yaşlıların %48.4'i eczacıların ilaçlarını anlayacakları şekilde anlattığını belirtmiş olup, %37.1'ü gerek duyduğunda sağlık sorunları ve ilaçlarıyla ilgili eczacıyla görüşüğünü belirtmiştir.

Huzurevinde yaşayan yaşlı hastalara yönelik düzenlenen akılcı ilaç kullanımı eğitiminin etkilerini değerlendiren bu çalışmada, eğitim sonrasında katılımcıların ilaçlarla ilgili bilgi düzeylerinde belirgin bir yükselme gözlemlenmiştir. Müdahale grubunda, eğitim sonrası ilaç bilgisi düzeyi ortalaması, eğitim öncesine göre anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0.05$). Bu durum, uygulanan eğitimin katılımcıların ilaç bilgisi düzeyini olumlu yönde etkilediğini göstermektedir. Kontrol grubunda ise, eğitim öncesi ve sonrası ilaç bilgisi düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$). Bu durum, kontrol grubuna herhangi bir müdahale yapılmadığı için beklenen bir sonuçtur. İlişkili örneklem t testi sonuçları, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu teyit etmiştir (Tablo 8).

Bu bulgular, uygulanan eğitimin sadece müdahale grubundaki katılımcıların ilaç bilgisi düzeyini artırdığını, kontrol grubunda ise böyle bir etki olmadığını göstermektedir. Bu sonuç, eğitimin ilaç bilgisi düzeyini artırmada etkili olduğunu desteklemektedir.

Tablo 8. Yaşlıların önce ve sonra yapılan öntest- sontest puanlarının dağılımları

Grup	N	Öntest (Ort. ± SS)	Sontest (Ort. ± SS)	Öntest-Sontest (Ort.) Farkı	t değeri	p değeri
Müdahale Grubu	30	16.03 ± 2.50	19.07 ± 2.30	3.04	3.75	$p < 0.05$
Kontrol Grubu	32	16.07 ± 2.40	16.09 ± 2.35	0.02	0.10	$p > 0.05$

Araştırmaya katılan yaşlıların %96.8'inin kronik hastalığa sahip olduğu, %56.5'inin hekimden %19.4'ünün eczacıdan ilaçları ve hastalıkları konusunda bilgi aldığı ve %40.3'ünün iki ve/veya üç ilaç kullandığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Tokem ve Karadokavan'ın çalışmasında elde edilen bulgular, yaşlı bireylerin çoğunlukla birden fazla kronik hastalığa sahip olduğunu ve bu nedenle ilaç kullanımı konusunda hemşire ve doktorlara başvurduklarını göstermektedir. Çalışmada, katılımcıların ortalama iki farklı ilaç kullandıkları belirtilmiştir [26]. Özbek ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da yaşlıların büyük çoğunluğunun doktor ve hemşireden bilgi aldıkları belirtilmiştir [27]. Bu çalışmada ise yaşlı hastaların %56.5'inin hekim tarafından ilaçları ve hastalıkları konusunda bilgilendirildiği saptanmıştır.

Çalışmamızda, katılımcıların %79'unda hipertansiyon saptanması, yaşlı nüfusun hipertansiyon prevalansının yüksekliğini bir kez daha teyit etmektedir. İlaç kullanım verileri de bu bulguyu destekler nitelikte olup, en sık kullanılan ilaç grubunun antihipertansifler olduğu görülmüştür. Bu sonuç, önceki çalışmalarda da sıklıkla rapor edilen hipertansiyonun yaşlılıkta en sık görülen kronik hastalıklardan biri olduğu bulgusuyla uyumludur [28]. Akıcı ve arkadaşlarının çalışmasında da antihipertansif ilaçların en sık reçete edilen ilaç grubu olduğu bulunmuştur. Araştırmanın bulguları, yaşlı popülasyonunda hipertansiyonun yaygınlığına dair önceki çalışmalarla uyumlu olup, yaşlılarda sıklıkla görülen hastalıkların ilaç kullanım profillerini yansıtmaktadır [21]. Çalışmamızda, katılımcıların %83.9'unun ilaçlarını düzenli olarak almada günlük yaşadığı belirlenmiştir. Bu bulgu, yaşlılarda ilaç uyumsuzluğunun yaygın bir sorun olduğunu ve bu bireylerin ilaç alımını hatırlatmaya yönelik desteklere

ihtiyaç duyduklarını göstermektedir. Yaşlı bireylerin farmakoterapiye uyumunda sıklıkla gözlenen bir sorun, reçeteli ilaçların yanı sıra reçetesiz satılan ilaçlar, bitkisel ürünler ve besin takviyeleri gibi tamamlayıcı ve alternatif tıp yöntemlerinin kullanımı ve bu durumun sağlık profesyonellerine bildirilmemesidir [29]. Bu durum, ilaç etkileşimleri riskini artırarak, tedavi etkinliğini azaltabilir ve istenmeyen yan etkilere neden olabilmektedir. Bu araştırmaya katılan yaşlı bireylerin %24.2'si bitkisel ürünler kullandıklarını belirtmişlerdir. Bu oran, yaşlı nüfusunda tamamlayıcı ve alternatif tıp yöntemlerinin yaygınlığını göstermektedir. Hastalar, mevcut tedavinin yetersiz kalacağı endişesiyle veya tedaviye destek sağlamak amacıyla sıklıkla bitkisel ürünlere başvurumaktadırlar. Bu durum, hastaların bilinçsiz bir şekilde tedaviye ek olarak bitkisel ürünler kullanmasına yol açmakta ve ilaç etkileşimleri gibi riskleri beraberinde getirmektedir [30].

Çalışmamızda, yaşlı bireylere verilen akılcı ilaç kullanımı eğitimi programının, katılımcıların ilaç bilgisi düzeylerindeki artışı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde etkilediği tespit edilmiştir. İlaç bilgi düzeyini ölçen 12 maddelik ölçekteki ön test ve son test puanları arasında yapılan karşılaştırmalar, eğitim programının katılımcıların ilaç bilgilerini önemli ölçüde artırdığını ortaya koymuştur. Bu sonuç, eğitim programının etkili olduğunu göstermektedir. Nilsen ve arkadaşlarının kontrol gruplu deneysel çalışmasında, yaşlılara verilen ilaç yönetimi eğitiminin, katılımcıların ilaç bilgilerini anlamlı ölçüde artırdığı sonucuna varılmıştır [31]. Ryan ve Bed tarafından yapılan araştırmada, yaşlılara yönelik ilaca uyum eğitimi programının, katılımcıların ilaca uyum düzeylerini önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir [32]. Rsnick ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, geriatrik rehabilitasyon ünitesinde yatan yaşlı bireylere verilen günlük ilaç yönetimi eğitimi sonucunda, katılımcıların ilaç bilgisi düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir [33]. Singapur'da gerçekleştirilen bir araştırmada, yüksek yatış riski taşıyan yaşlı hastaların evlerinde eczacılar tarafından yapılan ilaç incelemelerinin etkileri incelenmiştir. Çalışmaya dahil edilen 499 hastanın neredeyse tamamında (%93) ilaç kullanım sorunları tespit edilmiştir. Eczacı müdahalesi sonucunda, bu hastalarda hastaneye yatış oranlarında %26'luk anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, eczacıların evde ilaç takibinin, yaşlı hastaların ilaçlarını doğru kullanmalarını sağlayarak hastaneye yatışları önlemede önemli bir rol oynadığını göstermektedir [34]. İskoçya'nın Grampian bölgesinde yaşayan 65 yaş ve üzeri kronik hastalığı olan bireylerde, eczacı liderliğindeki ilaç incelemelerinin ilaç kullanımına uygunluğu ve sağlık sonuçları üzerindeki etkileri incelenmek üzere randomize kontrollü bir çalışma tasarlanmıştır. Çalışma sonuçları, eczacı müdahalesinin ilaç kullanımına ilişkin sorunların çözümünde etkili olduğunu göstermekle birlikte, ilaç maliyetleri ve yaşam kalitesi gibi diğer değişkenler üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını ortaya koymuştur [35]. Kronik hastalığı olan yaşlı bireylerde, eczacı liderliğindeki ilaç tedavisi yönetiminin etkilerini değerlendiren bir başka çalışmada, eczacıların ilaç tedavisine uyumun artırılmasının yanı sıra, hastaların tansiyon ve lipid düzeyleri gibi klinik parametrelerinde iyileşme ve sağlık sistemi maliyetlerinde azalma sağlamada önemli bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır [36]. Geriatrik popülasyonda glokom hastalığının farmakoterapötik yönetiminde eczacıların rolünü değerlendirmek amacıyla tasarlanan bir çalışmada, eczacı liderliğinde verilen eğitimin ilaç uyumu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışma sonuçları, eczacı müdahalesi alan grupta göz içi basıncı kontrolünde anlamlı bir iyileşme ve hastaların hastalık bilgisi düzeylerinde önemli bir artış olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, eczacıların, yaşlı glokom hastalarında ilaç uyumunu artırmada ve dolayısıyla hastalık prognozunu iyileştirmede etkili bir müdahale sağlayabileceğini desteklemektedir [37]. Geriatrik kanser hastalarında farmakoterapötik yönetiminde eczacı ve geriatrist işbirliğinin önemini değerlendiren bir çalışmada, eczacıların ilaç reçetelerindeki sorunları tespit etme ve ilaç kullanımına uygunluğu artırma konularında önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir [38]. Çalışmamızın sonuçları, önceki araştırmaların bulgularıyla uyumlu olup, elde edilen bulgular, eczacı merkezli eğitim polikliniklerinin kurulmasının, yaşlı hastaların ilaçlarına uyumunu artırmada ve sağlık sonuçlarını iyileştirmede önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Akılcı ilaç kullanımının yaşlılarda sağlanmasında tüm sağlık ekibinin rolü büyük olmakla birlikte, eczacılar tedavinin son aşamasında yer almaları ve hasta ile doğrudan iletişim kurmaları nedeniyle kritik bir öneme sahiptir. Akılcı ilaç kullanımının sağlanmasında eczacının, reçete edilen ilaçların farmakolojik özellikleri, kullanım şekli ve olası yan etkileri hakkında hasta eğitimi vermesi ve tedaviye uyumu desteklemesi büyük önem taşımaktadır. Yaşlı hastalarda akılcı ilaç kullanımının önemi göz önüne alındığında, eczacılık lisans programlarında bu alanda daha kapsamlı eğitimler verilmesi

gerekmektedir. Eczacıların yaşlı hastaların ilaç tedavilerinde etkin rol oynayabilmeleri için, lisans eğitimi sürecinde yaşlı farmakolojisi ve geriyatriye dair müfredatın güçlendirilmesi önem arz etmektedir.

Yaşlı hastalar, nüfusun büyük bir kısmını oluşturmasa da yaşadıkları toplumda en çok ilaç kullanan grup haline gelmektedir. İlaçların hem az sayıda hem de çoklu kullanımının yaşlılarda yaygın bir problem olduğu sonucuna varılmaktadır. Araştırma verileri değerlendirildiğinde yaşlılara eczacı tarafından verilen akılcı ilaç kullanımını kapsamındaki eğitimin yaşlıların ilaca uyumunu ve ilaç kullanımına ilişkin toplam bilgi puan ortalamalarını artırdığı saptanmıştır. Halkın en yakın sağlık danışmanı olmasıyla sağlık sistemimizin en önemli parçasını oluşturan eczacılık hizmetlerinin yaşlı hastalarda akılcı ilaç kullanımında önemli bir payı olduğu bilinmektedir. Araştırma sonuçları doğrultusunda; eczacılar ve diğer sağlık personellerinin yaşlı hastaları, hastalıkları ve ilaçları hakkında bilgilendirmeleri için ilgili kurumlarda eğitim polikliniklerinin oluşturulması önerilebilir. Yaşlıların buldukları merkezlerde ilaç bilgi düzeyini olumlu yönde etkileyen bu eğitimlerin sıklıkla yapılması ve yaşlıların hastalıklarının tedavisinde ilaç kullanımının önemi konusunda hekim ve eczacı tarafından bilgilendirilmesi gerekmektedir. Yaşlılara doğrudan sağlık hizmet sunumu gerçekleştiren merkezlerin kolay ulaşılabilir olması, yaşlılara pozitif ayrımcılık uygulanması, sağlıklı yaşlanma ve etkin bakım hizmeti sunumu planlanması gibi gelişmiş uygulamaları içermesi önem arz etmektedir. Yaşlı bireylerle çalışan sağlık personellerinin yetiştirilmesi ve eğitimlerine önem verilmesi, artan yaşlı nüfusun yaratabileceği sağlık sorunlarını azaltacağı düşünülmektedir. Bu bağlamda; eczacılık fakültelerinde mezuniyet öncesi dönemde verilecek olan geriatri eğitimlerinin, öğrencilerin yaşlı bireylere yaklaşımlarıyla ilgili bilgi, beceri ve tutumlarını olumlu yönde etkileyecektir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: Y.Ö., G.Ö.; Tasarım: Y.Ö., G.Ö.; Denetim: Y.Ö., G.Ö.; Kaynaklar: Y.Ö., G.Ö.; Malzemeler: Y.Ö., G.Ö.; Veri Toplama ve/veya İşleme: Y.Ö., G.Ö.; Analiz ve/veya Yorumlama: Y.Ö., G.Ö.; Literatür Taraması: Y.Ö., G.Ö.; Makalenin Yazılması: Y.Ö., G.Ö.; Kritik İnceleme: Y.Ö., G.Ö.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

ETİK KURUL ONAYI

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu'nun 13.06.2016 tarih ve 193 sayılı kararı ile etik kurulu onayı alınmıştır.

KAYNAKLAR

1. Konak, A., Çiğdem, Y. (2005). Yaşlılık olgusu: Sivas huzurevi örneği. Cumhuriyet Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Sosyal Bilimler Dergisi, 29(1), 23-63.
2. Beğen, T., Yavuzer, H. (2012). Yaşlılık ve yaşlılık epidemiyolojisi. Klinik Gelişim, 25(3), 1-3.
3. Tereci, D., Turan, G., Kasa, N., Öncel, T., Arslansoyu, N. (2016). Yaşlılık kavramına bir bakış. Ufku Ötesi Bilim Dergisi, 16(1), 84-116.
4. Çunkuş, N., Yiğitoğlu, G.T., Akbaş, E. (2019). Yaşlılık ve toplumsal dışlanma. Geriatrik Bilimler Dergisi, 2(2), 58-67.
5. Akgün, S., Bakar, C., Budakoğlu, İ. (2004). Dünya'da ve Türkiye'de yaşlı nüfus eğilimi, sorunları ve iyileştirme önerileri. Türk Geriatri Dergisi, 7(2), 105-110.
6. Yıldırım, Y.K. (2005). Yaşlı istismarı ve önlenmesi. Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Dergisi, 21(1), 167-174.
7. Arslan, Ş., Atalay, A., Kutsal, G.Y. (2000). Yaşlılarda ilaç tüketimi. Geriatri, 3(2), 56-60.
8. LeSage, J. (1991). Polypharmacy in geriatric patients. Nursing Clinics of North America, 26(2), 273-290. [CrossRef]

9. Wyles, H., Rehman, H.U. (2005). Inappropriate polypharmacy in the elderly. *European Journal of Internal Medicine*, 16(5), 311-313. [\[CrossRef\]](#)
10. Borman, P. (2009). Yaşlılarda akılcı ilaç kullanımı ilkeleri. *Turkish Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 55(2), 72-75.
11. Monette, J., Gurwitz, J.H., Avorn, J. (1995). Epidemiology of adverse drug events in the nursing home setting. *Drugs & Aging*, 7(3), 203-211.
12. Esengen, Ş., Seçkin, Ü., Borman, P., Bodur, H., Gökçe-Kutsal, Y., Yücel, M. (2000). Huzurevinde yaşayan bir grup yaşlıda fonksiyonel-kognitif değerlendirme ve ilaç kullanımı. *Geriatry*, 3(1), 6-10.
13. Tamam, L., Öner, S. (2001). Yaşlılık çağı depresyonları. *Demans Dergisi*, 1(2), 50-60.
14. Fessman, N., Lester, D. (2000). Loneliness and depression among elderly nursing home patients. *The International Journal of Aging and Human Development*, 51(2), 137-141.
15. Özer, U.H.E., Özdemir, Ö.G.D.L. (2009). Yaşlı bireyde akılcı ilaç kullanımı ve hemşirenin sorumlulukları. *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Hemşirelik Dergisi*, 16(2), 42-51.
16. Erenmemişoğlu, A. (2006). Yaşlılarda ilaç kullanımını etkileyen farmakokinetik değişiklikler. *Turkish Journal of Geriatrics*, 9, 29-32.
17. Garcia, R.M. (2006). Five ways you can reduce inappropriate prescribing in the elderly: A systematic review. *Journal of Family Practice*, 55(4), 305-312.
18. Akıcı, A. (2006). Akılcı ilaç kullanımı ilkeleri doğrultusunda yaşlılarda reçete yazma ve Türkiye'de yaşlılarda ilaç kullanımının boyutları. *Turkish Geriatric Journal*, 9, 19-27.
19. McCormack, P.M., Lawlor, R., Donegan, C., O'Neill, D., Smith, S., Moroney, C., Feely, J. (1997). Knowledge and attitudes to prescribed drugs in young and elderly patients. *Irish Medical Journal*, 90(1), 29-30.
20. Eski, Ö., Pınar, R. (2005). Kardiyovasküler problemi olan yaşlılarda ilaç kullanım hatalarının incelenmesi. *Turkish Journal of Geriatrics*, 8(3), 141-147.
21. Akıcı, A., Kalaça, S., Uğurlu, M.Ü., Çalı, Ş., Oktay, Ş. (2001). Pratisyen hekimlerin yaşlılarda akılcı ilaç kullanımı alışkanlıklarının değerlendirilmesi. *Turkish Journal of Geriatrics*, 4(3), 100-106.
22. Toklu, H., Dülger, G.A. (2011). Akılcı ilaç kullanımı ve eczacının rolü. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 15(3), 89-93.
23. Akıcı, A., Uğurlu, M.Ü., Gönüllü, N., Oktay, Ş., Kalaça, S. (2002). Pratisyen hekimlerin akılcı ilaç kullanımı konusunda bilgi ve tutumlarının değerlendirilmesi. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 11(7), 253-257.
24. Toklu, H.Z., Akıcı, A., Oktay, S., Sanda, C.A.L.I., Sezen, S.F., Uysal, M.K. (2010). The pharmacy practice of community pharmacists in Turkey. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 14(1), 53-60.
25. Akıcı, A., Kalaca, S., Uğurlu, M.Ü., Toklu, H.Z., Iskender, E., Oktay, Ş. (2004). Patient knowledge about drugs prescribed at primary healthcare facilities. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 13(12), 871-876. [\[CrossRef\]](#)
26. Tokem, Y., Karadakovan, A. (2004). Yaşlı bireylere verilen bireyselleştirilmiş ilaç programının ilaç yönetimleri üzerine etkisinin incelenmesi. *Sağlık ve Toplum*, 14(3), 79-87.
27. Bilgili, N. (2010). Ankara'da yaşayan bir grup yaşlı bireyde ilaç kullanım uygulamaları ve ilaç bilgi düzeylerinin belirlenmesi. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 9(1), 37-44.
28. Arslan, G.G., Eşer, İ. (2005). Yaşlılara verilen eğitimin ilaç kullanım uyumuna etkisinin incelenmesi. *Türk Geriatri Dergisi*, 8(3), 134-140.
29. Qato, D.M., Alexander, G.C., Conti, R.M., Johnson, M., Schumm, P., Lindau, S.T. (2008). Use of prescription and over-the-counter medications and dietary supplements among older adults in the United States. *Jama*, 300(24), 2867-2878. [\[CrossRef\]](#)
30. Dedeli, Ö., Karadakovan, A. (2011). Yaşlı bireylerde ilaç kullanımı, tamamlayıcı ve alternatif tedavi uygulamalarının incelenmesi. *Spatula Dd*, 1(1), 23-32.
31. Nilsen, R., Strømme, H.K., Laake, K. (1991). Testing of a simple information program to improve elderly patients' knowledge about their medication. *Tidsskrift for den Norske Laegeforening: Tidsskrift for Praktisk Medicin, ny Raekke*, 111(1), 23-25.
32. Ryan, A.A., Chambers, M. (2000). Medication management and older patients: An individualized and systematic approach. *Journal of Clinical Nursing*, 9(5), 732-741. [\[CrossRef\]](#)
33. Resnick, B., Slocum, D., Ra, L., Moffett, P. (1996). Geriatric rehabilitation: Nursing interventions and outcomes focusing on urinary function and knowledge of medications. *Rehabilitation Nursing Journal*, 21(3), 142-147. [\[CrossRef\]](#)
34. Cheen, M.H.H., Goon, C.P., Ong, W.C., Lim, P.S., Wan, C.N., Leong, M.Y., Khee, G.Y. (2017). Evaluation of a care transition program with pharmacist-provided home-based medication review for elderly Singaporeans at high risk of readmissions. *International Journal for Quality in Health Care*, 29(2), 200-205.

35. Krska, J., Cromarty, J.A., Arris, F., Jamieson, D., Hansford, D., Duffus, P.R., Seymour, D.G. (2001). Pharmacist-led medication review in patients over 65: A randomized, controlled trial in primary care. *Age and Ageing*, 30(3), 205-211. [\[CrossRef\]](#)
36. Wang, X., Wang, S., Yu, X., Ma, Z., Wang, H., Yang, J., Liu, L. (2021). Impact of pharmacist-led medication therapy management in ambulatory elderly patients with chronic diseases. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 87(7), 2937-2944. [\[CrossRef\]](#)
37. Aleem, A., Amin, F., Asim, M.H., Farooq, N., Arshad, S., Raziq, M. (2021). Impact of pharmacist-led interventions in improving adherence to glaucoma medications in the geriatric population. *European Journal of Hospital Pharmacy*, 28(e1), 191-196. [\[CrossRef\]](#)
38. Choukroun, C., Leguelinel-Blache, G., Roux-Marson, C., Jamet, C., Martin-Allier, A., Kinowski, J.M., Antoine, V. (2021). Impact of a pharmacist and geriatrician medication review on drug-related problems in older outpatients with cancer. *Journal of Geriatric Oncology*, 12(1), 57-63. [\[CrossRef\]](#)



CISTUS CRETICUS L.: ANTI-OBESITY, ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM PROPERTIES

CİSTUS CRETİCUS L.: ANTİOBEZİTE, ANTİMİKROBİYAL VE ANTİBİYOFİLM ÖZELLİKLERİ

Aslı CAN AĞCA^{1*} , **Derya ALTAY²** , **Başar KARACA³** , **Sibel ÖZDAŞ⁴** , **İpek CANATAR⁴** 

¹Ankara Yıldırım Beyazıt University, Institute of Public Health, Department of Traditional, Complementary and Integrative Medicine, Ankara, 06010, Türkiye

² Ankara Yıldırım Beyazıt University, Vocational School of Health Services, Department of Medical Services and Techniques, Ankara, 06760, Türkiye

³Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara 06100, Türkiye

⁴Adana Alpaslan Türkeş Science and Technology University, Faculty of Engineering Sciences, Department of Bioengineering, Adana, Türkiye

ABSTRACT

Objective: *Cistus creticus L.* is widespread in the coastal regions of Türkiye. In this study, we investigated the cytotoxic, antiobesity, antimicrobial and antibiofilm properties as well as the total phenolic and flavonoid content of both aqueous and ethanolic extracts in vitro.

Material and Method: Two different extracts were prepared from the flowering aerial parts of *Cistus creticus* using ethanol and water. The total phenolic content and total flavonoids were determined by the Folin-Ciocalteu method and the aluminum chloride colorimetry, respectively. The effect of extracts on the cell viability of 3T3-L1 was determined by methyl thiazole tetrazolium (MTT), and the evaluation of differentiation and the effects of the plant extracts on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes was performed by Oil-Red O staining. In addition, MIC values and antibiofilm activities were also investigated.

Result and Discussion: The total phenol content of the EtOH and water extract was determined to be 134.2849 mg GAE/g and 96.1803 mg GAE/g, respectively. The total flavonoids in the water and EtOH extracts were found to be 33.1942 mgQE/g and 22.8338 mgQE/g, respectively. The lowest MIC values were determined for the strains *Bacillus subtilis* DSM 1971, *Bacillus licheniformis* DSM 13 and *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7, while the highest MIC concentration was found for the strains *Escherichia coli* and *Eenterococcus gallinarum*. The MIC/16 concentration of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 also proved to be effective in inhibiting biofilm formation. We observed that noticeable but not strong effects on lipid accumulation were observed in 3T3-L1 adipocytes treated with EtOH extract.

Keywords: Antibiofilm property, antimicrobial activity, antiobesity activity, *Cistus creticus*, total flavonoid content, total phenol content

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar** Aslı CAN AĞCA
e-mail / e-posata: aslicanagca@aybu.edu.tr, Phone / Tel.: +903129062391

Submitted / Gönderilme : 26.09.2024

Accepted / Kabul : 09.12.2024

Published / Yayınlanma : 20.01.2025

ÖZ

Amaç: *Cistus creticus* L. Türkiye'nin kıyı bölgelerinde yaygın olarak bulunur. Bu çalışmada, sulu ve etanolü ekstraların sitotoksik, antiobezite, antimikrobiyal ve antibiyofilm özelliklerinin yanı sıra toplam fenolik ve flavonoit içeriği *in vitro* olarak araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: *Cistus creticus*'un çiçekli toprak üstü kısımlarından hareketle etanol ve su kullanılarak iki farklı ekstre hazırlanmıştır. Toplam fenolik içerik ve toplam flavonoidler sırasıyla Folin-Ciocalteu ve alüminyum klorür kolorimetrik yöntemleriyle belirlenmiştir. *Cistus creticus*'un toprak üstü kısımlarının etanolü ve sulu ekstralarının 3T3-L1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi metil tiyazol tetrazolyum (MTT) ile belirlenmiş ve bitki ekstralarının 3T3-L1 adipositlerinde farklılaşma ve lipid birikimi üzerindeki etkileri Yağ-Kırmızı O Boyama ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, MIC değerleri ve antibiyofilm aktiviteleri de incelenmiştir.

Sonuç ve Tartışma: EtOH ve sulu ekstraların toplam fenol içeriği sırasıyla 134.2849 mg GAE/g ve 96.1803 mg GAE/g olarak belirlenmiştir. Su ve EtOH ekstralarında toplam flavonoidlerin sırasıyla 33.1942 mgKE/g ve 22.8338 mgKE/g olduğu bulunmuştur. En düşük MİK değerleri *Bacillus subtilis* DSM 1971, *Bacillus licheniformis* DSM 13 ve *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7 suşları için belirlenirken, en yüksek MİK konsantrasyonu *Escherichia coli* ve *Enterococcus gallinarum* suşları için bulunmuştur. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Escherichia coli* ATCC 25922'nin MIC/16 konsantrasyonunun da biyofilm oluşumunu engellemede etkili olduğu kanıtlanmıştır. EtOH ekstresi ile muamele edilen 3T3-L1 adipositlerinde lipid birikimi üzerinde belirgin ancak güçlü olmayan etkiler gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyofilm özellik, antimikrobiyal aktivite, antiobezite aktivite, *Cistus creticus*, total fenol içeriği, toplam flavonoit içeriği

INTRODUCTION

The genus *Cistus* (known as rockrose), a member of the *Cistaceae* family, is native to Türkiye. Among them, *Cistus creticus* L. is widespread in the coastal regions of Türkiye [1]. *Cistus* species are used in Turkish folk medicine to treat rheumatism, stomach pain, hemorrhoids, inflammation of the urinary tract and diabetes mellitus [2,3]. They have been also employed in traditional folk medicine for their anti-inflammatory, antiulcerogenic, wound healing, antibacterial, cytotoxic and vasodilatory effects [4,5]. In Morocco, *Cistus creticus* is recognized and employed as a remedy for rheumatism [6].

The World Health Organization (WHO) defines obesity as a chronic and complicated disease characterized by an excess of stored fat, which can have a negative impact on health. It is also mentioned that obesity is not only a significant risk factor for type 2 diabetes and heart disease, bone health issues, reproductive problems, and some types of cancers but also has a negative impact on quality of life. WHO notes that antibiotic resistance and overweight/obesity are becoming increasingly serious health problems. Considering the traditional applications of different *Cistus* species in Türkiye, including their use for weight loss and antibacterial activity, the aim was to evaluate aqueous and ethanolic plant extracts concerning these two biological activities [7].

As the development of resistance to antibiotics complicates the treatment of infectious diseases, the search for new phytochemicals with potential antimicrobial and antibiofilm effects continues. In this context, the species of the genus *Cistus* L. occupy a prominent place in the literature. The species of *Cistus* L. exhibit remarkable biological activities, including antiviral, antiparasitic, antifungal and antibacterial effects [8]. Although there are many studies in the literature in which the antimicrobial activities of crude extracts of *Cistus* L. species have been tested, there are very few studies in which extracts obtained with different solvents have been comparatively tested against a large number of Gram-negative and Gram-positive strains, including multidrug-resistant strains such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Biofilms are microbial communities formed by microorganisms adhering to a surface and embedded in extracellular polymeric components [9]. The exopolymer matrix that encloses biofilm cells reduces the diffusion and efficacy of antimicrobial agents [10]. As multidrug resistance spreads and biofilms complicate the treatment of infectious diseases, the discovery of new antimicrobial agents that can prevent the formation of biofilms or remove existing biofilms is important. Due to their potential antimicrobial or antibiofilm properties, natural plant substances have been the subject of numerous

studies to discover novel antibiofilm agents in recent years [11].

Only a few studies in the literature evaluate the potential antibiofilm activity of *Cistus creticus*. Erdoğan et al. [12] emphasized in their studies that the aqueous extract of *Cistus creticus* showed remarkable biofilm activity against some important Gram-negative and Gram-positive strains. Interestingly, another study suggests that an 80% ethanol extract of *Cistus creticus* has no antibiotic effect on *Staphylococcus aureus* strains but stimulates biofilm production of some strains of *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* [13]. Conversely, Mocan et al. found that an 80% ethanol extract of *Cistus creticus ssp. creticus* significantly reduced biofilm production of the *P. aeruginosa* PA01 strain even at sub-inhibitory concentrations [14]. There is also evidence that the extract from *C. creticus* suppresses the microbial growth of some oral pathogens and the biofilm production of *Streptococcus mutans* [15].

In this study, we investigated the cytotoxic, anti-obesity and antimicrobial properties as well as the total phenolic and flavonoid content of the aqueous and ethanolic extracts from the flowering aerial parts of *Cistus creticus in vitro*. Considering the limited number of studies on the potential antibacterial effects of *Cistus creticus*, we also wanted to evaluate the potential antibiofilm activities of the extracts comparatively.

MATERIAL AND METHOD

Plant Material

The flowering aerial parts of *Cistus creticus* were collected in May 2021 in Adatepe, Çanakkale. The voucher specimen was registered in the herbarium of the Faculty of Pharmacy of Ankara University under the number AEF 30753.

Extraction Method

10 g of the air-dried and powdered plant were weighed separately. Two different extracts were prepared from the plant material by using ethanol and water. Each sample was extracted in an ultrasonic bath (Bandelin, Sonorex, Germany) at a frequency of 35 kHz for 60 min. The ethanolic extract was filtered and evaporated to dryness. The aqueous extract was filtered and freeze-dried.

Total Phenolic Content

The total phenolic content of the plant extracts was determined using Singleton and Rossi's method [16]. In each well, 30 µL of the sample was added, along with 15 µL of Folin reagent, and left to incubate for 3 min in the dark. The wells were then filled with 5% Na₂CO₃ and distilled water, they were subjected to incubation for 60 min. The absorbance value of the samples was obtained at 725 nm. The experiments were done in triplicate. The same procedure was performed with gallic acid and the outcomes were stated as mg of gallic acid equivalent (GAE) per g of crude extract for each sample.

Total Flavonoid Content

The total flavonoid content of the plant extracts was determined according to the method of Zhishen et al. [17]. Briefly, plant extract samples, Na-acetate and distilled water were added to each well. Following 5 min of incubation, 10% aluminum chloride was added and kept in the dark for 30 min. At 425 nm, the absorbance was recorded. The tests were carried out in triplicate. The same procedure was performed with quercetin and the outcomes were stated as mg of quercetin equivalent (QE) per g of crude extract for each sample.

Antimicrobial Activity

The list of strains evaluated in the antimicrobial activity tests is shown in the Supplementary file (Table 1).

Determination of Antimicrobial Activity by Disc Diffusion Method

The microorganisms listed in Table 1 are stored with 60% glycerol at -86 °C. First, the stock cultures were inoculated onto Tryptic Soy Agar (TSA, Merck, Darmstadt, Germany) plates using the

streak plate technique and the cultures were incubated at 37 °C for 18 h. The antimicrobial activity tests were performed with these subcultures. From the cultures developed on TSA plates, individual colonies were taken from each culture under aseptic conditions using a sterile loop and inoculated onto Mueller Hinton Agar (MHA, Merck, Darmstadt, Germany) plates. After incubation at 37 °C for 18 h, a single colony was selected from the grown cultures and the colonies were suspended in tubes containing 5 ml of sterile saline (0.9% NaCl) and culture densities were adjusted according to the 0.5 McFarland standard. The prepared suspensions were inoculated onto the surfaces of the MHA plates using sterile swabs and allowed to dry for a while under room conditions.

To test the antimicrobial efficacy of the ethanolic and aqueous extracts, previously prepared stocks of 10 and 5 mg/ml were used. 10 µl of the extracts were dropped onto sterile 6-mm discs. As a control group, absolute ethanol, which is used in the preparation of ethanolic extracts, was dropped onto the discs. The discs were placed on MHA plates and then the plates were incubated at 37 °C for 18 h. After incubation, the diameter of the inhibition zones was measured.

Minimum Inhibition Concentration (MIC) Test

In this experiment, the MIC values for the microorganisms susceptible to the ethanolic extract of *Cistus* sp. were determined taking into account the results of the disc diffusion method. In this context, the cultures of the susceptible microorganisms and the culture suspensions were prepared as previously described. First, 100 µl of Mueller Hinton Broth (MHB) medium was added to each well of the microdilution plates using a multichannel micropipette. Then a series of dilutions with 10 mg/ml ethanolic extract were prepared using the microdilution method. The wells containing only the medium and inoculum were designed as positive control wells and the wells containing only the medium were designed as negative control wells.

The microdilution plates were incubated at 37° C for 18 h. The concentration values of the first wells, in which no microbial growth was observed at the end of the incubation, were considered as MIC values. All tests for antimicrobial activity were carried out following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute [18].

Antibiofilm Activity of Ethanolic Extract

The strains *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, MRSA ATCC 43300 and *S. aureus* ATCC 25923 were used for the biofilm studies as they represent important Gram-negative and Gram-positive models. Modified media and incubation conditions were favored for each strain to promote biofilm production. In this context, TSB medium with 1% glucose was used for the *P. aeruginosa* ATCC 27853 strain, LB (Luria-Bertani) without NaCl for the *E. coli* ATCC 25922 strain and TSB medium with 3% NaCl for the MRSA ATCC 43300 and *S. aureus* ATCC 25923 strains [19,20].

In the first phase, the active cultures of all strains were prepared as described above. Single colonies were taken from the culture of each strain and inoculated into appropriate media (5 ml). Liquid cultures were incubated overnight at 37 °C (28 °C for *E. coli* ATCC 25922) to promote biofilm production [21]. At the end of incubation, the active culture of each strain was diluted 1:100 in the appropriate media. After the suspensions were prepared, 140 µl of the modified media were added to the wells of the 96-well U-bottom microtiter plates (LP Italiana, Italy). At this point, a serial dilution was performed for each strain taking into account the previously determined MIC values (2-fold, MIC, MIC/2, MIC/4, MIC/8...).

10 µl of each culture suspension was taken and inoculated into the wells of the microtiter plate. The wells containing only media and inoculum served as positive controls, and the wells containing only media served as negative controls. The plates were incubated under static conditions at 37 °C (28°C for *E. coli* ATCC 25922) for 24 h. At the end of incubation, a crystal violet binding assay was conducted. The wells were emptied and washed three times with sterile physiological saline to remove planktonic cells. The plates were dried at room temperature for 10 min and then 140 µl of a 95% methanol solution was added to the wells. The plates were again incubated at room temperature for 10 min and the plate wells were emptied. After fixation, 140 µl of a 0.1% crystal violet solution was added to the wells and the plates were incubated at room temperature for 30 min. At the end of the incubation, the wells were washed with sterile distilled water. 140 µl of an acetone-ethanol solution (30:70) was added to each

well. The plates were incubated for 15 mins at room temperature and the dissolved dyes were read in a microplate reader set to 595 nm [22].

Antiobesity Activity

Cell Culture

3T3-L1 (CRL-173) preadipocytes were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). The cell culture studies were based on Longo et al. [23].

The Effect of Ethanolic and Aqueous Extracts of Aerial Parts of *Cistus creticus* on Cell Viability of 3T3-L1 by Methyl Thiazole Tetrazolium (MTT)

To investigate cell viability and cytotoxicity, 3T3-L1 preadipocytes were treated with different concentrations of EtOH and aqueous extracts for 48 h and the MTT assay was performed according to the method described by Lee et al. [24]. Absorbance (Abs) in the wells was measured at 570 nm using a spectrophotometer (Uvmini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan) [25]. Cytotoxicity was calculated using the following formula. The half (50%) maximum inhibitory concentration (IC₅₀) of the plant extracts was calculated using a non-linear regression model.

Cell viability (%) = (Mean Abs_{570 nm} value of treated cells / Mean Abs_{570 nm} value of control cells) × 100.

Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes into Mature Adipocytes

Differentiation induction medium (DMI) was used to differentiate 3T3-L1 preadipocytes into mature adipocytes. For the experiments, 3T3-L1 preadipocytes were cultured and then differentiated into mature adipocytes in the absence or presence of EtOH or aqueous (at a concentration that maintains cell viability ≥90%) extracts of the plant for 8 days. Differentiated, untreated mature 3T3-L1 adipocytes were used as controls [26,27].

Evaluation of Differentiation and The Effect of Ethanolic and Aqueous Extracts of Aerial Parts of *Cistus creticus* on Lipid Accumulation in 3T3-L1 Adipocytes by Oil-Red O Staining

Evaluation of differentiation and effects of the plant extracts on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes by Oil-Red O staining was performed according to previous reports [27-29].

The Genotoxic Effect of Ethanolic and Aqueous Extracts Aerial Parts of *Cistus creticus* on 3T3-L1 Adipocytes by Agarose Gel Electrophoresis and DNA Fragmentation Assay

Agarose gel electrophoresis and DNA fragmentation assays were applied to determine the genotoxic effect of water and EtOH extracts of *Cistus creticus* on 3T3-L1 adipocytes [30].

DNA Extraction

At the end of the maturation period, a commercial kit was used according to the manufacturer's protocol for the extraction of genomic DNA from 3T3-L1 adipocytes [31].

DNA Gel Electrophoresis

For gel electrophoresis, the concentration of isolated DNA was measured using a spectrophotometer (Nanoprop 2000c, Thermo Scientific, USA) at 260 nm. DNA was then taken from each DNA sample with 15 µl and mixed with 4 µl of loading dye, loaded onto a 1.5% agarose gel and run at 110 Vot for 40 min. DNA was stained with 1.5 µl of SYBR-safe dye. The 1 kb DNA marker was used and the DNA fragments, and gels were visualized and photographed using an imaging system (BioSpectrum 810, UVP, USA) [32,33].

DNA Fragmentation Assay

For the diphenylamine method, the DNA sample was centrifuged at 10.000 rpm for 20 min at 4°C. The pellet and supernatant were mixed with 1/4 (v/v) trichloroacetic acid (TCA) and incubated at 4°C for 24 h. The samples were centrifuged for 20 min at 10.000 rpm at 4°C and the supernatant was

suspended in 5% TCA (v/v). It was incubated at 90°C for 15 min. Then, DPA solution (prepared with 50 µl of acetaldehyde, 10 ml of acetic acid, and 1.5 g of diphenylamine in 150 µl of sulfuric acid) was added to each sample and incubated at room temperature for 24 h. DNA was then stained with diphenylamine and Abs was measured at 600 nm using a spectrophotometer. DNA fragmentation was calculated using the following formula [34].

$$\text{Fragmented DNA (\%)} = [\text{Abs}_{600 \text{ nm}} (\text{Supernatant}) / (\text{Abs}_{600 \text{ nm}} (\text{Supernatant}) + \text{Abs}_{600 \text{ nm}} (\text{Pellet}))] \times 100$$

Statistical Analysis

Statistical Package for Social Science (SPSS) v24.0 version (Inc., Chicago, IL, USA) package program was used for statistical analysis of the data. All measurements made in the study were repeated three times. Data were expressed as mean ± SD. The One-ANOVA test (with Tamhane correction for post-hoc testing) was used to compare data between more than two independent groups for the data were normally distributed. Statistically, a p-value of <0.05 was considered significant. IC₅₀ values were analyzed using Graphpad Prism (Graphpad Software Inc.) software and calculated using the non-linear regression analysis method.

RESULT AND DISCUSSION

In the present study, total phenolic content and total flavonoids were determined in both EtOH and aqueous extracts of the flowering aerial part of *Cistus creticus* to investigate the relationship between antiobesity and antimicrobial activity. According to the results of this study, extraction with water gave a yield of 12.90%. The yield of extraction with EtOH was determined to be 8.10%. The total phenolic content of the EtOH and water extract of the plant sample was determined to be 134.2849 mg GAE/g and 96.1803 mg GAE/g, respectively. It was found that the total flavonoid content in the water and EtOH extract was 33.1942 mgQE/g and 22.8338 mgQE/g, respectively (Table 1). Our results are in agreement with those of Gedikoğlu et al. who determined a total phenolic content in methanol and water extracts of 135.24 mg GAE/g and 114.35 mg GAE/g, respectively [35]. The total flavonoid content was higher in the methanol (34.34 mg QE/g) than in the water extract (19.78 mg QE/g), which is consistent with our results.

As natural compounds are regarded to be significant sources of various pharmacological properties, studies on different biological activities of plant materials are growing day by day. Especially, there are major concerns about treating bacterial infections caused by microorganisms that exhibit antibiotic resistance, increasing the demand for novel antimicrobial agents.

Phytochemical studies have shown that *Cistus* species contain a variety of secondary metabolites, especially phenolic compounds and terpene derivatives [8]. *Cistus creticus* showed remarkable variability in the total amount of water-soluble chemicals, flavonol glycosides and derivatives of punicalagin. Two chemovariations were reported depending on whether punicalagin derivatives were present or not. It was also mentioned that the specific composition of polyphenolic compounds of *Cistus* species seems to be related to evolutionary events [36].

The broad spectrum of antimicrobial activity of *Cistus* essential oil and resin, which contain terpenic chemicals, has been demonstrated by earlier reports [37,38]. The disk diffusion method was used to examine the *in vitro* antimicrobial activity of extracts of water, methanol, chloroform, ethyl acetate, and butanol made from the dried and powdered leaves and fruits of five different *Cistus* species against the following microorganisms: *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and reported that butanol extract of *C. creticus* demonstrated antimicrobial activity against *S. aureus* while extracts of all *Cistus* species did not show any activity against *P. aeruginosa* and *C. albicans* [39].

Our findings on the diameters of the inhibition zones and the MIC values from the disc diffusion and MIC tests are listed in Table 2. None of the microbial strains tested showed susceptibility to the aqueous extract. However, the ethanolic extract showed antimicrobial activity, except for the strains *C. albicans* ATCC 26555 and *K. quasipneumoniae* subsp *similipneumoniae* ATCC 7006003. The inhibition zones were also observed in control groups including absolute ethanol seeded discs among

Gram-negative strains except *K. quasipneumoniae* subsp *similipneumoniae* ATCC 7006003 and *Shigella* sp. It was clearly established that the ethanolic extract content was superior to the control groups in terms of antimicrobial activity. While the concentration values from the MIC test were between 625 and 5000 µg/ml, the MIC value for the tested concentrations for strain *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* ATCC 7006003 could not be determined. This is because the maximum solubility of *Cistus* sp. in ethanol is 10 mg/ml. The lowest MIC values of 625 µg/mL were determined for the strains *B. subtilis* DSM 1971, *B. licheniformis* DSM 13 and *B. amyloliquefaciens* DSM 7, while the highest MIC concentration was found for the strains *E. coli* and *E. gallinarum*.

The antibiofilm activity of the extract against MRSA ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. coli* ATCC 25922 was shown in Figure 1. Each strain was treated with its MIC and sub-MIC concentrations for the antibiofilm activity of the ethanolic extract. The concentrations MIC, MIC/2, MIC/4 and MIC/8 of each strain proved to be very effective in inhibiting biofilm formation. The MIC/16 concentration of *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. coli* ATCC 25922 also proved to be effective in inhibiting biofilm formation. An earlier report by Erdoğan et al. showed varying degrees of antibiofilm efficacy against various bacteria at different doses and agreed with our findings [12].

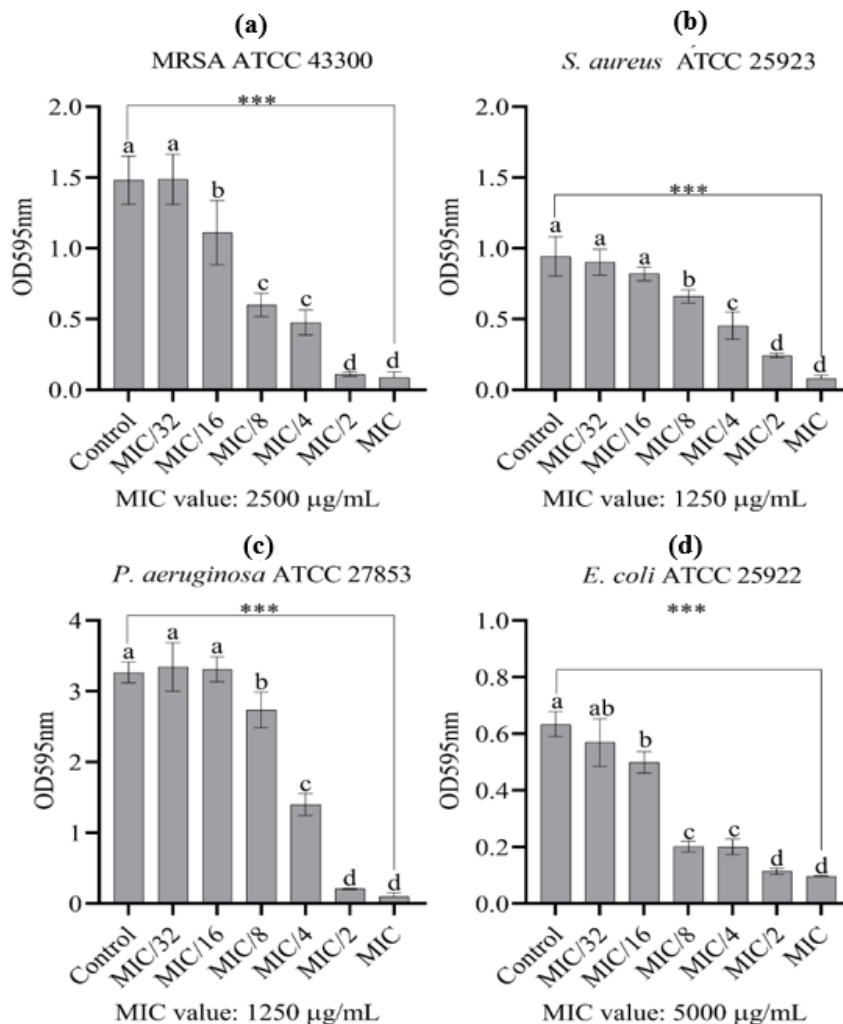


Figure 1. Antibiofilm effects of the ethanolic extract on the biofilm formation of the tested strains. (a) MRSA ATCC 43300 (b) *S. aureus* ATCC 25923 (c) *P. aeruginosa* ATCC 27853 (d) *E. coli* ATCC 25922. Different letters show statistical differences (One-Way ANOVA Test, Tukey's Test, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

We have also investigated the relationship between the anti-obesity activity and the extracts of *Cistus creticus*. Previous reports have mentioned the folkloric use of another species, *Cistus laurifolius*, as a weight-loss and antidiabetic agent [40,41]. We started by determining the effect of the plant parts on the viability of 3T3-L1 preadipocytes exposed to different concentrations of EtOH and aqueous extracts (0-2500 µg/ml) for 48 h. The results are shown in Figure 2.

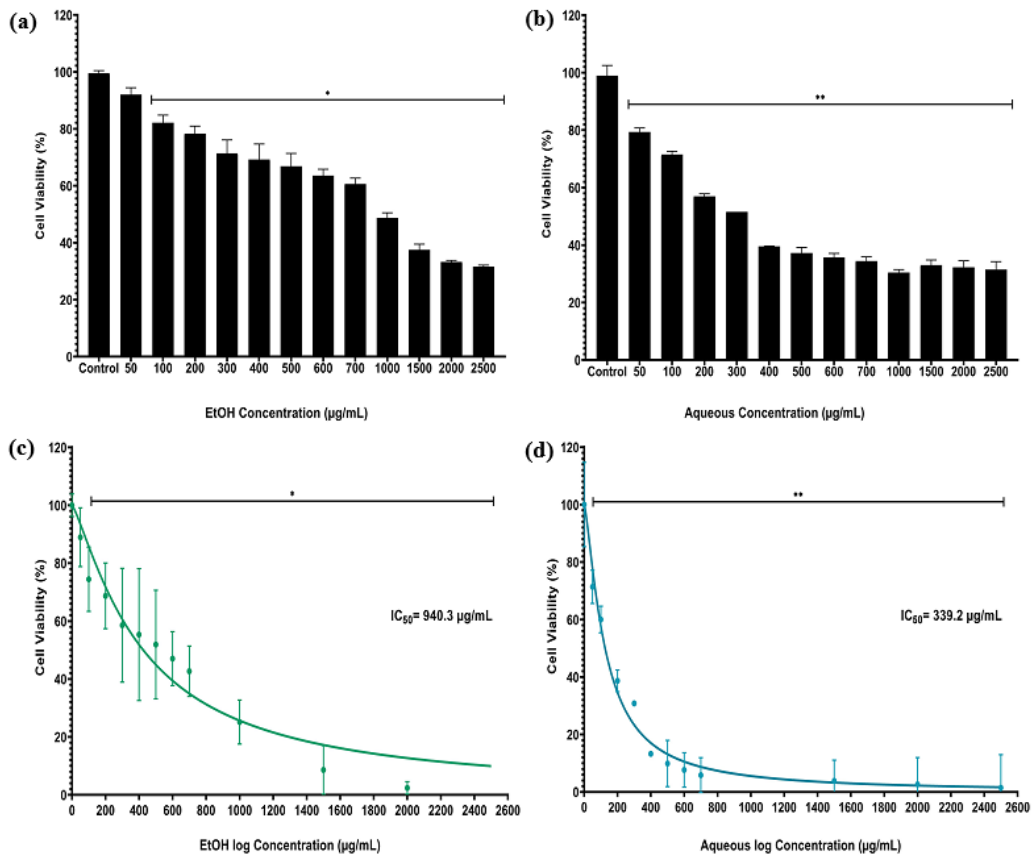


Figure 2. Effect of plant extracts on cell viability. (a) and (b): MTT assay data of extracts. 3T3-L1 preadipocytes cultured in 96-well plate were subjected to treatment with increasing concentration of EtOH or aqueous extracts of *C. creticus* for 48 hours. Cytotoxicity was then determined by the MTT test. In addition, the cell in the medium without plant extract was used as the control, and the cell in the medium containing 0.01% DMSO without the plant extract was used as vehicle control. (c) and (d): IC₅₀ value of the extracts. IC₅₀ was calculated by nonlinear regression model. Data were expressed as the mean \pm SD from three independent experiments. One-way ANOVA test was used for statistical analysis. * $p < 0.005$; and ** $p < 0.005$ significantly different from untreated 3T3-L1 preadipocyte.

MTT: Methylthiazole tetrazolium; EtOH: Ethanol; DMSO: Dimethyl sulfoxide; IC₅₀: half (50%) maximum inhibition concentration; SD: Standard deviation

Cells exposed to a concentration of 50 µg/ml *Cistus creticus* EtOH extract showed a 10% reduction in viability compared to the control, which continued significantly at higher concentrations, so these concentrations were used in subsequent experiments (Figure 2a). The aqueous extract significantly reduced cell viability even at lower doses of 20 µg/ml (Figure 2b). Therefore, concentrations of 50 µg/ml EtOH extract and 20 µg/ml aqueous extract were used in subsequent experiments.

The extract concentration (IC₅₀) that caused a 50% reduction in cell viability was determined to be 940.3 ± 3.062 µg/ml and 339.2 ± 1.850 µg/ml for EtOH and aqueous extract, respectively (Figure 2c, 2d). At the end of the treatment, oil red staining was performed to confirm terminal adipocyte

differentiation and to evaluate the effect of *Cistus creticus* extracts on lipid accumulation of mature adipocytes (Figure 3). Under the inverted microscope, a reduction in Oil-Red-O staining was observed in the treated group of mature 3T3-L1 adipocytes treated with EtOH and aqueous extracts of *Cistus creticus* compared to the untreated adipocyte controls (Figure 3a). Compared to the untreated adipocyte controls, a clear and significant effect on lipid accumulation was observed in the 3T3-L1 adipocytes treated with EtOH extract, with a value of 32.10%. The percentage value of lipid accumulation of the aqueous extracts was reported to be 16.78% (Table 3). These data indicate that *Cistus creticus* inhibits adipogenesis in mature 3T3-L1 adipocytes by reducing lipid droplets.

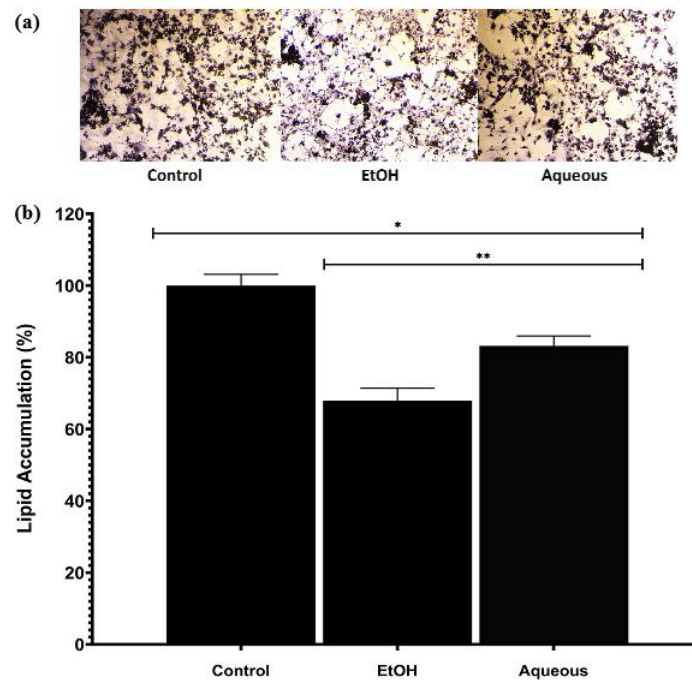


Figure 3. The effect of aerial parts of the extracts of *C. creticus* on adipogenesis and lipid accumulation. (a) Preadipocytes were differentiated into mature adipocytes for 8 days in the absence of extract treatment of *C. creticus* in DM or in the presence of EtOH (50 µg/ml) or Aqueous extract (20 µg/ml). Differentiated and untreated adipocytes were used as controls. Microscopic images of cells stained with Oil-Red O at 10X magnification. (b) Quantitative data of Oil-Red O staining. The data with relative change of OD490 obtained from three independent experiments were presented as mean \pm SD and expressed as floor change compared to the control. A one-way ANOVA test was used for statistical analysis. * $p < 0.005$ is significantly different from untreated 3T3-L1 adipocytes. ** $p < 0.005$ is significantly different from the EtOH extract. EtOH: Ethanol; DM: Differentiation medium; OD: Optical density; SD: Standard deviation

At the end of the treatment, the genotoxic activity of the flowering plant parts of *C. creticus* on mature adipocytes was evaluated by agarose gel electrophoresis, DNA fragmentation assay and diphenylamine method (Figure 4). No significant laddering was observed in the DNA samples isolated from 3T3L-1 cells treated with extracts of *C. creticus* by agarose gel electrophoresis (Figure 4a). DNA fragmentation in the cells treated with EtOH or aqueous extract of the plant increased by 6.02% and 8.6%, respectively, compared to the control group using the diphenylamine method, but this increase was not statistically significant ($p = 0.1148$ and $p = 0.0112$, respectively). These data show that treatment with *Cistus creticus* has no genotoxic effect on 3T3-L1 cells.

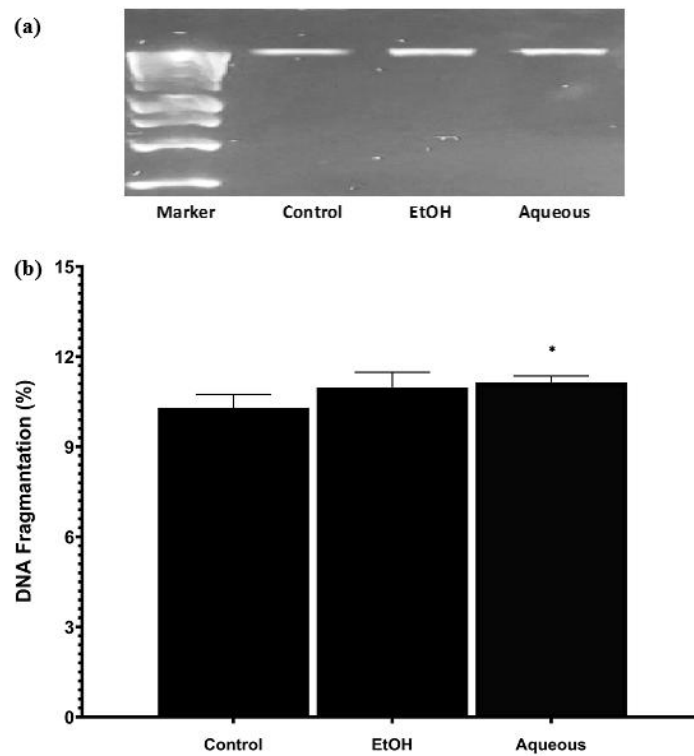


Figure 4. The effect of the aerial parts of *Cistus creticus* extracts on genotoxicity. (a) DNA gel electrophoresis data of the plant extracts. Preadipocytes were differentiated into mature adipocytes for 8 days in the absence of extract treatment of *Cistus creticus* in DM or in the presence of EtOH (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or aqueous extract (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Differentiated and untreated adipocytes were used as controls. Representative image of the electrophoretic pattern of DNA isolated from 3T3-L1 cells in agarose gel (20 $\mu\text{l}/\text{band}$). 1 bp DNA was used as a ladder marker. (b) Quantitative data of DNA fragmentation by diphenylamine method. OD600 data obtained from three independent experiments were presented as mean \pm SD. A one-way ANOVA test was used for statistical analysis. $p < 0.005$, treated and untreated 3T3-L1 adipocytes are similar. EtOH: Ethanol; DM: Differentiation medium; OD: Optical density; SD: Standard deviation

Obesity is a growing problem with limited therapeutic options. It may be useful to evaluate the therapeutic benefits of plants based on their traditional use through experimental designs. To this end, we investigated the anti-obesity, antimicrobial and antibiofilm activities of the flowering aerial parts of *Cistus creticus* and found that a noticeable, but not strong, effect on lipid accumulation was observed in 3T3-L1 adipose cells treated with an EtOH extract. In addition, antimicrobial and antibiofilm properties were also observed and the conclusions should be useful for future research.

Table 1. The total phenolic and total flavonoid content of *Cistus creticus* extracts

	Total phenolic content mg GAE/g extract	Total flavonoids mg QE/g extract
EtOH extract	134.285 \pm 0.052	33.194 \pm 0.034
Aqueous extract	96.180 \pm 0.035	22.834 \pm 0.003

Table 2. The diameters of the inhibition zones and the MIC values from the disc diffusion and MIC tests for the extracts of *Cistus creticus*

Microorganisms	Zone of Inhibition (mm)			MIC Concentration (µg/ml)
	Ethanollic extract	Aqueous extract	Control	
<i>B. subtilis</i> DSM 1971 (ATCC 21394)	14.33 ± 0.58	-*	-	625
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	11.67 ± 0.58	-	-	2500
<i>B. licheniformis</i> DSM 13 (ATCC 14580)	13.50 ± 0.58	-	-	625
<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7	17.67 ± 0.58	-	-	625
<i>C. albicans</i> ATCC 26555	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	14 ± 0.00	-	7 ± 0.00	5000
<i>E. coli</i> ATCC 11230	14.33 ± 0.58	-	7.33 ± 0.58	5000
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	13 ± 0.00	-	-	2500
<i>E. gallinarum</i>	14.67 ± 0.29	-	-	5000
<i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> ATCC 700603	-	-	-	5000 < **
<i>L. monocytogenes</i> NCTC 5348	20.33 ± 1.15	-	-	2500
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	14 ± 0.87	-	8.83 ± 0.29	1250
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Infantis</i> DMC12	13.83 ± 1.04	-	7 ± 0.00	2500
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> DMC4	15 ± 0.00	-	6.67 ± 0.29	2500
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Montevideo</i>	11 ± 0.00	-	8 ± 0.00	2500
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> ATCC 13311	14 ± 0.50	-	11.33 ± 0.29	1250
<i>Shigella</i> sp.	13 ± 0.00	-	-	2500
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	15 ± 0.00	-	-	1250
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	15 ± 1.00	-	-	2500
Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> ATCC 43300	13 ± 0.00	-	-	2500

*“-” indicates that there was no antimicrobial activity

**MIC value cannot be detected for tested concentrations

“±” indicates standard deviation

Table 3. Effects of EtOH and aqueous extracts of the plant on cell viability, lipid accumulation and DNA fragmentation

	Cell viability (µg/ml)	Lipid accumulation (%)
EtOH extract	940.3 ± 3.062	32.10
Aqueous extract	339.2 ± 1.850	16.78

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Prof. Dr. Hayri Duman (Gazi University, Faculty of Science, Department of Biology) for the identification of the plant material.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: A.C.A.; Design: A.C.A.; Control: A.C.A., B.K., S.Ö.; Sources: A.C.A., B.K., S.Ö.; Materials: A.C.A., B.K., S.Ö.; Data Collection and/or Processing: A.C.A., D.A., B.K., S.Ö., İ.C.; Analysis and/or Interpretation: A.C.A., D.A., B.K., S.Ö., İ.C.; Literature Review: A.C.A., B.K.; Manuscript Writing: A.C.A., B.K., S.Ö.; Critical Review: A.C.A., D.A., B.K., S.Ö., İ.C.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

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

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

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

REFERENCES

1. Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M. (2007). *Farmasötik Botanik*, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, p. 245.
2. Baytop T. (1999). *Türkiye’de Bitkilerle Tedavi*, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, p. 284.
3. Tuzlacı E. (2016). *Türkiye Bitkileri Geleneksel İlaç Rehberi*, İstanbul Medika Yayıncılık, İstanbul, p. 53, 311, 667-668, 822.
4. Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Roldán, C., Guillén, E., Saura, D., Segura-Carretero, A., Micola, V. (2011). A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: Evolutionary relationship. *Phytochemical Analysis*, 22, 303-312. [CrossRef]
5. Tomou, E.-M., Krystalia-Lytra, K., Rallis, S., Tzakos, A.G., Skaltsa, H. (2022). An updated review of genus *Cistus* L. since 2014: Traditional uses, phytochemistry, and pharmacological properties. *Phytochemical Review*, 21, 2049-2087. [CrossRef]
6. El-Ghazouani, F., El-Ouahmani, N., Teixidor-Toneu, I, Yacoubi, B., Zekhnini, A. (2021). A survey of medicinal plants used in traditional medicine by women and herbalists from the city of Agadir, southwest of Morocco. *European Journal of Integrative Medicine*, 42, 101284. [CrossRef]
7. World Health Organisation Web site. (2024). Retrieved date March 1, 2024, from <https://www.who.int/>. Accessed date: 05.03.2024.
8. Zalegh, I., Akssira, M., Bourhia, M., Mellouki, F., Rhallabi, N., Salamatullah, A.M., Alkaltham, M.S., Alyahya, H.K., Mhand, R.A. (2021). A review on *Cistus* sp.: Phytochemical and antimicrobial activities. *Plants*, 10(6), 1214. [CrossRef]
9. Watnick, P., Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2675-2679. [CrossRef]
10. Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 999-1007. [CrossRef]
11. Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y., Cheng, Q., Zhu, J., Li, M. (2019). Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese Medicine*, 14(11), 1-17. [CrossRef]
12. Erdoğan, S.F., Bilecen, C., Erdal-Altıntaş, Ö., Ulukütük, S., Kargıoğlu, M. (2022). The antibiofilm effects of some *Cistus* spp. against pathogenic microorganisms. *International Journal of Plant Based Pharmaceuticals*, 2(2), 252-260. [CrossRef]
13. Onal, N.F., Ozturk, I., Aydin Kose, F., Der, G., Kilinc, E., Baykan, S. (2023). Comparative evaluation of polyphenol contents and biological activities of five *Cistus* L. species native to Turkey. *Chemistry & Biodiversity*, 20(1), e202200915. [CrossRef]
14. Mocan, A., Fernandes, Â., Calhelha, R. C., Gavrilas, L., Ferreira, I.C., Ivanov, M., Sokovic, M., Barros, L., Băbotă, M. (2022). Bioactive compounds and functional properties of herbal preparations of *Cystus creticus* L. collected from Rhodes Island. *Frontiers in Nutrition*, 9, 881210. [CrossRef]
15. Hickl, J., Argyropoulou, A., Sakavitsi, M. E., Halabalaki, M., Al-Ahmad, A., Hellwig, E., Aligiannis N., Skaltssounis, A.L., Wittmer, A., Vach, K., Karygianni, L. (2018). Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *PLoS One*, 13(12), e0207574. [CrossRef]
16. Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158. [CrossRef]

17. Zhinsen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559. [\[CrossRef\]](#)
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Web site. (2024). M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement, USA. Retrieved date March 1, 2024, from <https://www.who.int/>. Accessed date: 05.03.2024.
19. Römling, U., Sierralta, W.D., Eriksson, K., Normark, S. (1998). Multicellular and aggregative behavior of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Molecular Microbiology*, 28(2), 249-264. [\[CrossRef\]](#)
20. Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-179. [\[CrossRef\]](#)
21. Vestby, L.K., Møretro, T., Langsrud, S., Heir, E., Nesse, L.L. (2009). Biofilm-forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories. *BMC Veterinary Research*, 5(20), 1-6. [\[CrossRef\]](#)
22. Onbas, T., Osmanagaoglu, O., Kiran, F. (2019). Potential properties of *Lactobacillus plantarum* F-10 as a bio-control strategy for wound infections. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 1110-1123. [\[CrossRef\]](#)
23. Longo, M., Spinelli, R., D'Esposito, V., Zatterale, F., Fiory, F., Nigro, C., Raciti, G.A., Miele, C., Formisano, P., Beguinot, F., Di Jaso, B. (2016). Pathologic endoplasmic reticulum stress induced by glucotoxic insults inhibits adipocyte differentiation and induces an inflammatory phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(6), 1146-1156. [\[CrossRef\]](#)
24. Lee, H.W., Rhee, D.K., Kim, B.O., Pyo, S. (2018). Inhibitory effect of sinigrin on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells: Involvement of AMPK and MAPK pathways. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 102, 670-680. [\[CrossRef\]](#)
25. Ho, J.N., Son, M.E., Lim, W.C., Lim, S.T., Cho, H.Y. (2012). Anti-obesity effects of germinated brown rice extract through down-regulation of lipogenic genes in high fat diet-induced obese mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76(6), 1068-1074. [\[CrossRef\]](#)
26. Raciti, G.A., Fiory, F., Campitelli, M., Desiderio, A., Spinelli, R., Longo, M., Nigro, C., Pepe, G., Sommella, E., Campiglia, P., Formisano, P., Beguinot, F., Miele, C. (2018). *Citrus aurantium* L. dry extracts promote C/ebp β expression and improve adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *PLoS One*, 13(3), 0193704. [\[CrossRef\]](#)
27. Karunakaran, R.S., Lokanatha, O., Muni-Swamy, G., Venkataramaiah, C., Muni-Kesavulu, M., Appa-Rao, C., Badri, K.R., Balaji M. (2021). Anti-obesity and lipid-lowering activity of Bauhiniastatin-1 is mediated through PPAR- γ /AMPK expressions in diet-induced obese rat model. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 704074. [\[CrossRef\]](#)
28. Liu, X.F., Bera, T.K., Kahue, C., Escobar, T., Fei, Z., Raciti, G.A., Pastan, I. (2012). ANKRD26 and its interacting partners TRIO, GPS2, HMMR and DIPA regulate adipogenesis in 3T3-L1 cells. *PLoS One*, 7(5), e38130. [\[CrossRef\]](#)
29. Nunez, S.K., Young, C., Adebayo, O., Muppuru, K.M., Badri, K.R. (2019). P311, a novel intrinsically disordered protein, regulates adipocyte development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 515(1), 234-240. [\[CrossRef\]](#)
30. Lu, T., Xu, Y., Mericle, M.T., Mellgren, R.L. (2002). Participation of the conventional calpains in apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1590(1-3), 16-26. [\[CrossRef\]](#)
31. Per, S., Ercan, F.S. (2015). Comparison of three methods of DNA extraction from *Parachipteria willmanni* (Acari: Oribatida) collected in Turkey. *Journal of Biotechnology Research*, 1(4), 16-20.
32. Glasel, J.A. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by A260/A280 absorbance ratios. *Biotechniques*, 18(1), 62-63.
33. Manchester, K.L. (1996). Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. *Biotechniques*, 20(6), 968-970. [\[CrossRef\]](#)
34. Burton, K. (1956). The study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the calorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *The Biochemical Journal*, 62(2), 615-623. [\[CrossRef\]](#)
35. Gedikoğlu, A., Öztürk, H.İ., Aytaç, E. (2023). The effect of different solvents on chemical composition, antioxidant activity, and antimicrobial potential of Turkish *Cistus creticus* extracts. *GIDA*, 48(4), 728-740. [\[CrossRef\]](#)
36. Lukas, B., Bragagna, L., Starzyk, K., Labeledz, K., Stolze, K., Novak, J. (2021). Polyphenol diversity and antioxidant activity of European *Cistus creticus* L. (Cistaceae) compared to six further, partly sympatric *Cistus* species. *Plants*, 10(4), 615. [\[CrossRef\]](#)

37. Demetzos, C., Loukis, A., Spiliotis, V., Zoakis, N., Stratigakis, N., Katerinopoulos, H.E. (1995). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* L. *Journal of Essential Oil Research*, 7(4), 407-410. [\[CrossRef\]](#)
38. Demetzos, C., Stahl, B., Anastassaki, T., Gazouli, M., Tzouvelekis, L.S., Rallis, M. (1999). Chemical analysis and antimicrobial activity of the *Resin Ladano*, of its essential oil and of the isolated compounds. *Planta Medica*, 65(1), 76-78. [\[CrossRef\]](#)
39. Güvenç, A., Yıldız, S., Özkan, A.M., Erdurak, C.S., Coşkun, M., Yılmaz, G., Okuyama, T., Okada (2005). Antimicrobiological studies on Turkish *Cistus* species. *Pharmaceutical Biology* 43(2), 178-183. [\[CrossRef\]](#)
40. Arıtuluk, Z.C. (2010). Master of Science Thesis. Flora and folk medicines of Tefenni (Burdur) District. Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey.
41. Sargin, S.A. (2021). Plants used against obesity in Turkish folk medicine: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 270, 113841. [\[CrossRef\]](#)



NIGELLA SATIVA L.: AN OVERVIEW

NİGELLA SATIVA L.: GENEL BAKIŞ

Şirin Hatice GÜREL^{1,2*} , Derya ÇİÇEK POLAT³ 

¹Başkent University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 06790, Ankara, Türkiye

²Ankara University, Graduate School of Health Sciences, 06560 Ankara, Türkiye

³Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, 06560, Ankara, Türkiye

ABSTRACT

Objective: *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae) is an annual herbaceous plant indigenous to the Mediterranean region and Western Asia globally. It is cultivated in Türkiye, especially in Isparta, Burdur and Afyonkarahisar. While its seeds are known for their characteristic black color in many languages, in Türkiye, it is recognized as "çörek otu". Traditionally, its seeds have been utilized for addressing rheumatism, bronchitis, colds, asthma and inflammatory conditions, as well as to enhance milk production in lactating mothers, aid digestion, and combat parasitic infections. Meanwhile, its oil is applied to address skin issues like boils and eczema. Additionally, because of its pungent bitter flavor and fragrance, it serves as a seasoning in Middle Eastern and Indian cuisines. The purpose of this review is to undertake a thorough analysis of the literature concerning the scientific classification and morphology, traditional uses pharmacological effects and phytochemistry of the plant.

Result and Discussion: *Nigella* seeds contain abundant carbohydrates, proteins, fat, essential amino acids, diverse minerals and vitamins. The seeds contain 30-40% fixed oil, with 50-60% of the fixed oil consisting of unsaturated fatty acids such as oleic acid and linoleic acid. The seeds furthermore contain 0.4-0.45% essential oil. The primary constituents of the essential oil include thymoquinone, carvacrol, p-cymene, thymol, t-anethole, α -terpinene and pinene. Additionally, the seeds comprise alkaloids like nigellimine, nigellicine, nigellamine, and nigellidine; saponins such as hederin and hederagenin; and compounds carrying various coumarin structures. The aerial parts are rich in flavonoid compounds such as nigelflavonoside B, nigelloside, quercetin, kaempferol, and rutin. The antioxidant, anti-inflammatory, antihistaminic, anti-aging, antihypertensive, anticoagulant, antimicrobial, antihelminthic, antineoplastic, hepatoprotective, nephroprotective, neuroprotective, and wound healing activities of *Nigella sativa* have been identified through in vitro, in vivo, and clinical research. In conclusion, *Nigella sativa* L. (black cumin) is a valuable medicinal plant with versatile health benefits. Further exploration of its therapeutic applications holds great promise for the development of new pharmaceuticals and nutraceuticals to combat various ailments and improve human health.

Keywords: Black cumin, *Nigella sativa*, pharmacological activity, phytochemistry, Ranunculaceae

ÖZ

Amaç: *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae), dünyada Akdeniz Bölgesi ve Batı Asya'ya özgü tek yıllık otsu bir bitkidir. Türkiye'de özellikle Isparta, Burdur ve Afyonkarahisar'da yetiştirilmektedir. Pek çok dilde tohumları karakteristik siyah rengiyle tanınırken, Türkiye'de "çörek otu" olarak bilinmektedir. Geleneksel olarak tohumları astım, bronşit, soğuk algınlığı, romatizma ve iltihaplı

* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Şirin Hatice Gürel
e-mail / e-posta: sirinhaticegurel@gmail.com, Phone / Tel.: +905427107536

Submitted / Gönderilme : 01.07.2024

Accepted / Kabul : 03.09.2024

Published / Yayınlanma : 20.01.2025

hastalıkların tedavisinde, emziren annelerde süt üretimini artırmada, sindirimi kolaylaştırmada ve parazit enfeksiyonlarıyla mücadelede kullanılırken, yağı ise egzama, çıban gibi cilt problemlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca keskin acı tadı ve aroması nedeniyle Hint ve Orta Doğu mutfaklarında baharat olarak tercih edilmektedir. Bu derlemenin amacı, bitkinin bilimsel sınıflandırılması ve morfolojisi, geleneksel kullanımı, farmakolojik etkileri ve fitokimyası ile ilgili literatürün kapsamlı bir analizini yapmaktır.

Sonuç ve Tartışma: Çörek otu tohumları karbonhidratlar, yağlar, proteinler, esansiyel amino asitler, çeşitli vitaminler ve mineraller açısından zengindir. Tohumlar %30-40 oranında sabit yağ içerir ve sabit yağın %50-60'ı linoleik asit ve oleik asit gibi doymamış yağ asitlerinden oluşur. Tohumlar ayrıca %0.4-0.45 oranında esansiyel yağ içerir. Esansiyel yağın ana bileşenleri timokinon, p-simen, karvakrol, α -terpinen, timol, pinen ve t-anetoldur. Ayrıca tohumlar nigellisin, nigellidin, nigellimin ve nigellamin gibi alkaloidler; hederin ve hederagenin gibi saponinler ve çeşitli kumarin yapıları taşıyan bileşikler içerir. Toprak üstü kısımları nigelflavonozit B, nigellozit, kersetin, kemferol ve rutin gibi flavonoid bileşikler açısından zengindir. *Nigella sativa*'nın antioksidan, anti-inflamatuar, antihistaminik, anti-aging, antihipertansif, antikoagülan, antimikrobiyal, antihelmintik, antineoplastik, hepatoprotektif, nefroprotektif, nöroprotektif ve yara iyileştirici aktiviteleri in vivo, in vitro ve klinik çalışmalarla belirlenmiştir. Sonuç olarak çörek otu sağlık açısından çok yönlü faydaları olan değerli bir şifalı bitkidir. Terapötik uygulamalarının daha fazla araştırılması, çeşitli rahatsızlıklarla mücadele etmek ve insan sağlığını iyileştirmek için yeni farmasötiklerin ve nutrasötiklerin geliştirilmesi için büyük umut vadetmektedir.

Anahtar Kelimeler: Çörek otu, farmakolojik aktivite, fitokimya, *Nigella sativa*, Ranunculaceae

INTRODUCTION

Nigella sativa L. (Syn: *Nigella cretica* Miller) is an annual herbaceous plant belonging to the Ranunculaceae family. This plant boasts a lengthy history and has been extensively utilized across numerous countries. The first evidence of its historical use dates back to the seeds discovered within the burial site of the Egyptian pharaoh Tutankhamun in the Valley of the Kings, dating between 1333 and 1323 BC. It is known that the Egyptian queen Cleopatra also used the seed oil for skincare. In ancient texts and historical records, it is referred to as the "miracle plant," "universal remedy," "sacred plant," and "plant from heaven" by ancient healers [1-4].

Black cumin has also been prescribed and used by Hippocrates and Dioscorides for digestive complaints and colds [2,3]. The statement attributed to the Prophet Muhammad (PBUH), "Utilize this black seed, for it is a cure for all ailments except death." and the Arabic term "Habbah Al-Baraka," meaning endless wealth, reflect the importance of this plant [1,2]. Its local names in many languages usually emphasize the characteristic black color of its seeds. In French, it is called "Cumin Noir," in German "Echter Schwarzkümmel," and in Hindi "kalonji." In Turkish, it is traditionally referred to as "çörek otu," mainly because it is commonly used in baking [1,2].

The native habitat of *Nigella sativa* is the Western Asia and Mediterranean region, with its cultivation expanding from Asia to America and Africa. North Africa, India, and Türkiye are considered its secondary homeland. Currently, it is cultivated in many countries, spanning Asia, the Middle East and Europe, including Saudi Arabia, Syria and Türkiye (Figure 1) [5-13].



Figure 1. Geographical distribution of *Nigella sativa* [14]

There are 14 species of the genus *Nigella* growing in Türkiye, including 5 endemic taxa. However, the cultivated and commercially important species are *Nigella sativa* and *Nigella damascana* L. [4,15,16].

Scientific Classification and Morphology

Division	: Spermatophyta
Subdivision	: Angiospermae
Class	: Dicotyledones
Subclass	: Dialypetalae
Order	: Ranales
Family	: Ranunculaceae
Genus	: <i>Nigella</i> L.
Species	: <i>Nigella sativa</i> L. [1,4].

Nigella sativa is 15-30 cm tall, branched, pubescent, or shortly viscid-hirsute or absent. It has finely dissected leaves, each segment oblong-lanceolate and rather short. Flowers non involucrate. Sepals ovate, whitish and shortly clawed. Petals bluish, bluntly acuminate, ovate and shortly stalked (Figure 2). Fruits swollen, hard capsule formed by the fusion of 5 follicles up to the apex. Involucre is filiformly divided. Styles are long and erect, persisting at the apex of the follicles. Seeds are numerous, black-colored, angular, and three-sided. *Nigellae semen* is rich in essential oil. Flowering occurs between the 5th and 7th months. It is locally cultivated in fields [4,9,17].



Figure 2. *Nigella sativa* L. [14]

Nigella sativa thrives in sunny, temperate, and warm climates, producing good seeds in well-drained soils that are slightly clayey and sandy-loamy, rich in nutrients. It does not require excessive watering due to its low moisture needs. Planting time is in the fall in regions with mild winters (usually the first half of November) and in the spring in regions with harsher climates (mostly March, no later than mid-April). After sowing, seeds germinate within about a week and emerge within two weeks. The period when the plant starts to yellow and the capsules turn black indicates the harvesting time. Harvesting should be done at the end of July and in August, preferably in the early morning hours. The harvested seeds are dried in the shade and in a dry environment with good air circulation [4,15].

Traditional Use

Nigella sativa has a longstanding history of use across various countries and cultures as both a spice and a remedy for diverse ailments. Ibn Sina, in his most famous work "The Canon of Medicine - El-Kanun fit-Tib" describes black cumin as a seed that revitalizes the body and alleviates fatigue and boredom [2]. It has been frequently described and recommended in Prophetic Medicine, Unani Medicine, African, and Eastern Medicine, as well as in Arab, Chinese, and Ayurvedic Medicine. Both

the seeds and the oil have been utilized for medicinal purposes in Asia, Africa and the Middle East for centuries [7,11,18].

In the Southeast Asian and Middle East nations, the seeds have conventionally been employed to alleviate rheumatism, bronchitis, colds, asthma and inflammatory conditions, as well as to enhance milk production in lactating mothers, aid digestion, and combat parasitic infections. Meanwhile, its oil is applied to address skin issues like boils and eczema. Additionally, it has been used as an antiseptic and local anesthetic for scorpion, spider, snake, dog and cat bites. In India, the seeds are employed as anthelmintic, diaphoretic and carminative agents. Dried capsules are inhaled to regain lost sense of smell and are also utilized to deter certain insects and moths [1,7,11,19,20].

It is known that ancient Egyptian and Greek doctors prescribed seeds for various ailments such as headaches, toothaches, intestinal worms and nasal congestion. They were also used as regulators of menstruation, lactagogues, and diuretics. External applications of the seeds, mixed with a small amount of binding flour or soaked in water, have been mentioned for conditions such as abscesses, nasal ulcers, orchitis, rheumatism, and swelling of the hands and feet [10,21]. Additionally, because of its pungent bitter flavor and fragrance, it serves as a seasoning in Middle Eastern and Indian cuisines, especially in bread, yogurt, pickles, sauces, and salads. It is also known to have been used in ancient Egypt for mummification as a preservative [12,20,21].

In Türkiye, in the Central Anatolia region, decoctions of black cumin seed are used due to their abortifacient effects. After boiling the seeds and allowing them to cool, they are wrapped around the chest to treat the common cold. In Akşehir (Konya) and its surroundings, adults consume powdered black cumin seed for abdominal pain, while in children, 2-3 drops of the essential oil are used. In Ermenek (Karaman) and its surroundings, black cumin oil is dropped into the ear to treat earaches. In Muğla, seeds of black cumin are crushed or boiled and used as a syrup in the treatment of kidney stones [9,22,23,24].

Phytochemical Content

Black cumin seeds are quite rich in content; they contain carbohydrates, proteins, fat, essential amino acids, diverse minerals, vitamins and essential oil. As monosaccharides, they contain glucose, rhamnose, xylose, and arabinose. They contain vitamins B₁, B₂, B₃, B₆, B₉, C, A and minerals such as Mg, Fe, P, Cu, Ca, Zn, Se, Na, and Mn. About 30-40% of the fixed oil found in the seeds consists of 50-60% unsaturated fatty acids. These contents varies according to the climate, environmental conditions, and harvesting characteristics of the region where the plant grows [15,25,26,27,28,29].

The main components of the fixed oil extracted from black cumin seeds include linoleic acid, β -sitosterol and oleic acid. The fractions of the fixed oil are given in Table 1. Additionally, black cumin seed contains 0.4-0.45% essential oil. The primary constituents of the essential oil include thymoquinone, dihydrothymoquinone, carvacrol, p-cymene, α -thujene, thymol, trans-anethole, α -terpinene, α -pinene and β -pinene. The concentration of essential oil fractions is given in Table 2 [7,28,30].

Table 1. The chemical makeup of the fixed oil extracted from black cumin seeds [27]

Composition of fixed oil	Range % (w/w)
Arachidic acid	2-3
Eicosadienoic acid	2-2.5
Linoleic acid	44.7-56
Linolenic acid	0.6-1.8
Myristic acid	0.16
Oleic acid	20.7-24.6
Palmitic acid	12-14.3
Palmitoleic acid	3
Stearic acid	2.7-3
Sterols	0.5

Table 2. The chemical make up of the essential oil obtained from black cumin seeds [30]

Composition of essential oil	Concentration (%)
α -Pinene	1.48
α -Thujene	2.4
β -Pinene	1.72
Carvacrol	10.8
Dihydrothymoquinone	3.84
Minor components	23.81
p-Cymene	32.02
t- Anethole	2.10
Thymol	2.32
Thymoquinone	23.25

Black cumin seeds contain alkaloids such as nigellicine, nigellidine containing an imidazole ring, nigellimine carrying an isoquinoline ring, and nigellimine N-oxide and nigellamine carrying a tropane ring in addition to fixed and essential oil. Additionally, various flavonoid compounds such as kaempferol-3-O-rutinoside, kaempferol-3,7-diglucoside, nigelloside, rutin and nigellflavonoside B have been detected. Furthermore, it has been observed that hederin (melanthin), hederagenin (melanthenin) saponins along with 6-methoxy coumarin, 7-hydroxy coumarin, and 7-oxo coumarin are present [7,12,28,31-33].

Pharmacological Potential of *Nigella sativa* and Its Effect on Biological Activities

Antioxidant Effect

Studies have shown that *Nigella sativa* seeds and the essential and fixed oils obtained from the seeds exhibit antioxidant activity through linoleic acid-based and β -carotene antioxidant activity tests, ABTS Radical Cation Scavenging Activity Assay, Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) Assay and DPPH Radical Scavenging Capacity Assay, as well as *in vivo* animal experiments. This effect has been associated with the total phenolic content. It is believed that the compounds α -thujene, p-cymene, and thymoquinone found in the essential oil are the main responsible components for this effect. Comparative studies have found that the essential oil has higher antioxidant activity compared to the fixed oil. Additionally, it has been observed that oil obtained by supercritical fluid extraction contains elevated levels of unsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, and polyphenol content compared to oils derived from solvent extraction and cold pressing methods, and thus, is associated with a higher antioxidant effect [30,32,34-41].

Analgesic, Anti-inflammatory, and Wound Healing Effect

Various *in vivo* tests conducted on rats and rabbits have shown that black cumin hydrosol, essential and fixed oils can promote wound healing and have analgesic effects. Biopsy and histological examinations have revealed accelerated wound healing processes, while a decrease in licking and writhing counts in animals has indicated analgesic effects. Additionally, the applied treatment has been found to reduce acute inflammatory reactions [38,42,43].

In clinical trials involving patients with osteoarthritis, significant reductions in serum levels of the inflammatory and oxidative stress marker CRP (C-reactive protein) have been observed after oral administration of black cumin oil. Topical application of black cumin oil has also been thought to provide significant improvements in general, physical, and mental health sub-scales. Throughout the treatment, patients were evaluated based on VAS (Visual Analog Skala) and WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index) scores, revealing a decrease in the dosage of analgesic drugs used by patients and the analgesic effect of black cumin oil [44-46].

Antihistaminic Effect and Effect on Asthma

In vivo studies conducted on mice and rats have shown that black cumin oil reduces the frequency of nasal itching observed in allergic rhinitis, significantly alleviates nasal symptoms, reduces the

gathering of inflammatory cells in the nasal lavage fluid, nasal mucosa, and prevents typical inflammatory changes and inflammation [47,48].

Clinical trials conducted on patients with asthma have found that black cumin oil regulates the TH 17/Treg balance. Additionally, improvements in Asthma Control Test scores, significant reductions in blood eosinophils, fractional exhaled nitric oxide (FeNO), immunoglobulin E, and interferon- γ levels have been observed [49-51].

Anti-aging and Anti-alopecia Effect

The anti-aging and anti-melanogenic properties of black cumin seed extract and oil have been demonstrated through various tests, suggesting its potential as a cosmetic agent. *In vitro* tests have shown that black cumin inhibits advanced glycation end product formation, elastase and collagenase activity and collagen cross-linking while reducing melanin content and cellular tyrosinase activity in B16-F10 cells. Additionally, it has been found to significantly suppress the mRNA expression levels of genes linked to melanogenesis and tyrosinase-related proteins 1 and 2. In a 42-day study conducted on mice, black cumin oil was observed to reduce lipid peroxidation, fat, Bax/Bcl-2 proteins levels, and regulate the expression of caspase-3 proteins in brain and liver tissues [52,53].

Research on both mice and humans has indicated that topical application of *Nigella sativa* essential oil and decoction effectively prevents hair loss in mice and significantly improves hair growth in 70% of individuals participating in the study. Videodermatoscopic analysis has also revealed patients experienced a notable increase in hair density and thickness [54-55].

Anti-infertility Effect

Black cumin oil and flower honey have been found to significantly alleviate testicular and sperm abnormalities in male rats and mice with induced testicular damage, as observed through biochemical and histological examinations. They have corrected total testosterone (TT) and sex-hormone binding globulin (SHBG) levels, increased testis weight, and improved sperm quality. It has been discovered that black cumin oil is more efficacious than flower honey [56,57]. Female rats with polycystic ovary syndrome (PCOS) treated with hydroalcoholic extract derived from *Nigella sativa* seeds for 3 weeks have shown regulation of fertility-related hormones. Significant improvement in ovarian tissue, reduction in cysts, and normal luteinization have also been observed. These effects are attributed to the plant's phytosterol content and its hypoglycemic and antioxidant effects, which are believed to contribute to PCOS recovery [58].

Anticoagulant and Antihypertensive Effect

The alcoholic extract of *Nigella sativa* seed has been found to prolong the prothrombin time (PT), thrombin time (TT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) in clotting tests, while its oil has exhibited concentration-dependent clot lysis activity on clotted human blood and its aqueous extract has shown antiplatelet activity [59-61]. Its antihypertensive effect has been tested in both animals and humans. Intravenous injection of the aqueous extract of black cumin seeds in mice resulted in a decrease in mean arterial blood pressure and a reduction in heart rate, which is dependent on the dosage. In a clinical study involving hypertensive patients, significant reductions in diastolic and systolic blood pressure were recorded after an 8-week treatment period, along with a significant increase in glomerular filtration rate [62].

Antimicrobial and Anthelmintic Effect

Different researches have indicated that black cumin seed extract, its essential oil, and flower honey exhibit antifungal and antimicrobial effects against various fungi, bacteria, and virus species. The essential oil has been effective against *Colletorichum gloeosporoides* and *Penicillium digitatum*, while the seed extract and flower honey have shown effectiveness against *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Mucor rammanianus*, and *Candida albicans* species. It has been observed that the antimicrobial activity is higher against gram-positive strains than gram-negatives [36,63-66]. The anthelmintic properties of aqueous and methanol extracts derived from *Nigella sativa* seeds have been studied on different species

with the methanol extract being more active. It has been observed to cause a dose-related paralysis and reduce egg levels in fecal samples [67,68].

Antineoplastic Effect

The aqueous extract of black cumin seeds, nanoemulsion prepared from its tincture, its fixed oil, and its essential oil, particularly the major component thymoquinone, has been tested on various cancer cell lines (for instance A2780, HepG2, HUVEC, MDA-MB-231 and MCF-7), suggesting the potential of *Nigella sativa* as an agent in cancer treatment. Studies have shown that black cumin triggers cell cycle cessation and enhances apoptosis, exhibiting molecular binding with apoptotic proteins like Bax, Bcl-2, p53, STAT3, and Caspase-3/9. It inhibits cell growth, modifies the morphology of cancer cells, and reduces cell multiplication and survival [69-73].

Gastrointestinal System Effect

The effect of *Nigella sativa* oil and seed hydroalcoholic extract on gastric ulcers has been investigated in rats, showing a gastroprotective effect. After 7 days of treatment, black cumin reduced the gastric ulcer index, malondialdehyde, and protein content, while increasing total thiol, mucus content and total hexose. However, it had no impact on the secretion of gastric acid [74,75]. Following oral administration of the seed hydroalcoholic extract in rats, a dose-dependent decrease in gastrointestinal motility, defecation frequency, and water content in feces was observed, indicating an antidiarrheal effect. Moreover, intraperitoneal application of black cumin seed oil markedly decreased the extent of intestinal injury in rats with enterocolitis. Additionally, an increase in villus length, width, and percentage of goblet cells was observed in the duodenum, jejunum, and ileum of rats. Black cumin is suggested to have enhanced and protective effects on food absorption [76-78].

Hypoglycemic, Hypolipidemic, and Hepatoprotective Effect

Alcoholic extracts of *Nigella sativa* seed and aerial parts have been studied through *in vitro*, *in vivo*, and clinical trials, investigating their hypoglycemic and hypolipidemic effects. *In vitro* tests for inhibiting α -glucosidase and PTP1B (Protein Tyrosine Phosphatase 1B) have shown that the aerial parts exhibit antidiabetic effects. After 28 days of treatment in diabetic rats, significant decreases in glucose, urea, creatinine, uric acid, total protein, total cholesterol, and LDL (Low Density Lipoprotein) stages, along with an enhance in HDL (High Density Lipoprotein), were observed. Additionally, impaired AST (Aspartate Aminotransferase), ALP (Alkaline Phosphatase) and ALT (Alanine Aminotransferase) values returned to normal levels. In mice with liver damage, improvement was observed in serum oxidative stress indicators, liver function markers, biochemical parameters and histopathological assessments, with a reduction in ALT and AST levels, which were caused by concavalin A-induced injuries [32,79,80,81].

Clinical studies conducted with diabetic patients have observed a decrease in insulin, HbA1c, glucose, CRP, TG (Triglyceride), LDL, ALP, AST and ALT grades, along with a rise in HDL, following the administration of the plant extract. Moreover, when *Nigella sativa* was used in conjunction with exercise, the observed effects were further enhanced [82,83].

Nephroprotective and Neuroprotective Effects

In vivo studies with rats and clinical trials with humans have shown that the fixed oil and ethanol extract of *Nigella sativa* seeds reduce serum creatinine, 24-hour total urinary protein, blood glucose and urea levels, while increasing 24-hour total urinary volume, glomerular filtration rate and hemoglobin levels. Additionally, histopathological examinations have demonstrated a significant protective effect against kidney toxicity [84-86].

The impact of black cumin seed extract and fixed oil on the central nervous system have been investigated in various experimental animal models with rats and mice. Black cumin has been found to exhibit anxiolytic and anticonvulsant effects, reduce locomotor activity and the frequency of various stages of epileptic seizures, decrease brain 5-Hydroxyindoleacetic Acid (5-HIAA) levels, increase open field activity, brain serotonin (5-HT) levels, and significantly increase brain and plasma tryptophan levels. Furthermore, the primary constituent of the essential oil, thymoquinone, has been shown to have

protective effects against cytotoxicity and neurotoxicity caused by amyloid beta specific to Alzheimer's disease, as well as against synaptic toxicity induced by alpha-synuclein accumulation in individuals diagnosed with Parkinson's disease and Lewy body dementia [87-91].

Allelopathic Effect

The chemical compositions of *Nigella sativa* at different growth stages and its allelopathic effects on *Lactuca sativa* L. have been studied, revealing that the quantity of secondary metabolites fluctuates depending on the plant's growth stages. Consequently, it has been determined to possess allelopathic effects. The aqueous extract obtained from the above-ground parts during the vegetative stage demonstrated the highest toxicity towards lettuce germination. Similarly, the aqueous extract derived from *Nigella sativa* during the flowering stage was found to be the most detrimental to lettuce growth. [92,93].

Toxicity

Various studies have found *Nigella sativa* seeds and its components to be quite safe. LD₅₀ (Median Lethal Dose) values have been examined in studies conducted on mice and rats, along with possible biochemical, hematological, and histopathological changes. Histological examinations have shown no changes in heart, liver, kidney, and pancreatic tissues, stable liver enzymes, and high LD₅₀ values (794.3 mg/kg for oral intake in rats, 57.5 mg/kg for intraperitoneal administration). *Nigella* seeds have shown little to no toxic effects in practice, indicating a wide safety margin for therapeutic doses [3,12,21].

RESULT AND DISCUSSION

Nigella sativa L., commonly called as "çörek otu" in Türkiye, is an annual herbaceous plant with a long-standing history of traditional medicinal uses. Originating from the Mediterranean regions and Western Asia, it is cultivated extensively in Türkiye, particularly in regions like Afyon, Burdur, and Isparta. The *Nigella sativa* seeds, renowned for their characteristic black color, have been employed traditionally to address a wide array of health issues, ranging from respiratory ailments like asthma and bronchitis to inflammatory conditions, digestive problems, and skin disorders. Moreover, these seeds serve as a flavoring in Middle Eastern and Indian cuisines, adding both flavor and nutritional value.

Chemical analysis reveals that *Nigella* seeds are packed with essential nutrients, including fats, carbohydrates, proteins, minerals and vitamins. Notably, they contain a significant amount of fixed oil, predominantly comprising unsaturated fatty acids like oleic acid and linoleic acid, along with essential oils abundant in compounds like thymoquinone, p-cymene, and carvacrol. Furthermore, *Nigella* seeds harbor alkaloids, saponins, and flavonoids, among other bioactive constituents, which contribute to their diverse pharmacological properties.

Extensive research, encompassing *in vitro*, *in vivo*, and clinical studies, has unveiled the remarkable therapeutic potential of *Nigella sativa*. Its extracts and derivatives exhibit antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, antihypertensive, and hepatoprotective activities, among others. Additionally, *Nigella sativa* demonstrates promising prospects in the fields of wound healing, neuroprotection, and anticancer therapy.

In conclusion, the comprehensive examination of the literature regarding the phytochemistry, pharmacognosy and pharmacological effects of *Nigella sativa* underscores its significance as a valuable medicinal plant with multifaceted health benefits. Further exploration of its therapeutic applications holds great promise for the development of novel pharmaceuticals and nutraceuticals to combat various ailments and enhance human health.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: Ş.H.G., D.Ç.P.; Design: Ş.H.G., D.Ç.P.; Control: D.Ç.P.; Sources: Ş.H.G., D.Ç.P.; Materials: Ş.H.G., D.Ç.P.; Data Collection and/or Processing: Ş.H.G., D.Ç.P.; Analysis and/or Interpretation: Ş.H.G., D.Ç.P.; Literature Review: Ş.H.G.; Manuscript Writing: Ş.H.G., D.Ç.P.; Critical Review: Ş.H.G., D.Ç.P.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

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

REFERENCES

- Berkoz, M. (2022). *Nigella sativa* L. In: F.T.G Dereli and M. Ilhan and T. Belwal (Eds.), *Novel Drug Targets with Traditional Herbal Medicines: Scientific and Clinical Evidence*, (pp. 445-462). Switzerland: Springer Nature.
- Gun, M. (2012). Kutsal tohum (*Nigella sativa*): Çörek otunun iyileştirici etkisine ilişkin bazı bilgiler. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi*, 2(1), 43-46.
- Salama, R.H. (2010). Clinical and therapeutic trials of *Nigella sativa*. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 9(5), 513-522.
- Davis, P.H. (1970). *Flora of Turkey and The East Aegean Islands Volume 1*. Edinburgh University Press, Edinburgh, p.98-105.
- Gali-Muhtasib, H., El-Najjar, N., Schneider-Stock, R. (2006). The medicinal potential of black seed (*Nigella sativa*) and its components. *Advances in Phytomedicine*, 2, 133-153. [CrossRef]
- Haq, M., Singh, R., Nadeem, A., Rasool, S., Wani, J.A., Khan, A., Ashafaq, M., Makeen, H.A., Zehra, U. (2022). *Nigella sativa*: A Promise for Industrial and Agricultural Economic Growth. In: A. Khan and M.U. Rehman (Eds.), *Black Seeds (Nigella sativa) Pharmacological and Therapeutic Applications*, (pp. 439-460). Amsterdam: Elsevier. [CrossRef]
- Kooti, W., Hasanzadeh-Noohi, Z., Sharafi-Ahvazi, N., Asadi-Samani, M., Ashtary-Larky, D. (2016). Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed (*Nigella sativa*). *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(10), 732-745. [CrossRef]
- Luetjohann, S. (1998). *Healing Power of Black Cumin*, Lotus Light, Germany, p.15-24.
- Ozkan, A.M.G. (2011). *Nigella sativa* Çörekotu. In: L. Demirezer and T. Ersoz and I. Saracoglu and B. Sener (Eds.), *Tedavide Kullanılan Bitkiler FFD Monografları*, (pp. 423-431). Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri.
- Salem, M.L. (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*, 5(13-14), 1749-1770. [CrossRef]
- Sharma, N.K., Ahirwar, D., Jhade, D., Gupta, S. (2009). Medicinal and pharmacological potential of *Nigella sativa*: A review. *Ethnobotanical Leaflets*, 2009(7), Article 11, 946-955. Retrieved October 12, 2024, from <https://opensiuc.lib.siu.edu/ebl/vol2009/iss7/11>. Accessed date: 15.02.2024.
- Sudhir, S.P., Deshmukh, V.O., Verma, H.N. (2016). *Nigella sativa* seed, a novel beauty care ingredient: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(8), 3185-3196.
- Sultana, S., Asif, H.M., Akhtar, N., Iqbal, A., Nazar, H., Rehman, R.U. (2015). *Nigella sativa*: Monograph. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(4), 103-106.
- Plants of World Online Web site, Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew (2024). Retrieved February 15, 2024, from <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:711687-1>. Accessed date: 15.02.2024.
- Cakmakci, S., Cakır, Y. (2011). Çörekotu (*Nigella sativa* L.): Bileşimi, gıda sanayinde kullanımını ve sağlık üzerine etkileri. *Academic Food Journal*, 9(3), 61-69.
- Bizimbitkiler Online Web site. (2013). *Nigella*, from <http://www.bizimbitkiler.org.tr>. Accessed date: 15.02.2024.
- Tanker, N., Koyuncu, M., Coskun, M. (2021). *Farmasötik Botanik*, 7th Edition. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara. p.176-362.
- Majeed, A., Muhammad, Z., Ahmad, H., Hayat, S.S.S., Inayat, N., Siyyar, S. (2021). *Nigella sativa* L.: Uses in traditional and contemporary medicines-an overview. *Acta Ecologica Sinica*, 41(4), 253-258. [CrossRef]
- Bajwa, J., Sharma, S. (2021). *Nigella sativa*-a folklore remedy. *International Journal of All Research Education and Scientific Methods (IJARESM)*, 9(7), 2004-2012.
- Javed, S., Shahid, A.A., Haider, M.S., Umeera, A., Ahmad, R., Mushtaq, S. (2012). Nutritional, phytochemical potential and pharmacological evaluation of *Nigella sativa* (kalonji) and *Trachyspermum ammi* (ajwain). *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(5), 768-775.
- Gilani, A.U.H., Jabeen, Q., Khan, M.A.U. (2004). A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*. *Pakistan Journal Biological Sciences*, 7(4), 441-451.

22. Honda, G., Yesilada, E., Tabata, M., Sezik, E., Fujita, T., Takeda, Y., Takaishi, Y., Tanaka, T. (1996). Traditional medicine in Turkey VI. folk medicine in west Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın provinces. *Journal of Ethnopharmacology*, 53(2), 75-87. [\[CrossRef\]](#)
23. Sezik, E., Yesilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in Turkey X. folk medicine in central Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2-3), 95-115. [\[CrossRef\]](#)
24. Yesilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y., Takaishi, Y. (1995). Traditional medicine in Turkey. V. folk medicine in the inner Taurus Mountains. *Journal of Ethnopharmacology*, 46(3), 133-152. [\[CrossRef\]](#)
25. Bulca, S. (2014). Çörek otunun bileşenleri ve bu yağın ve diğer bazı uçucu yağların antioksidan olarak gıda teknolojisinde kullanımı. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(2), 29-36.
26. Burdock, G.A. (2022). Assessment of black cumin (*Nigella sativa* L.) as a food ingredient and putative therapeutic agent. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 128, 105088. [\[CrossRef\]](#)
27. El-Tahir, K.E.H., Bakeet, D.M. (2006). The black seed *Nigella sativa* Linnaeus-a mine for multi cures: A plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 1(1), 1-19. [\[CrossRef\]](#)
28. Randhawa, M.A., Al-Ghamdi, M.S. (2002). A review of the pharmaco-therapeutic effects of *Nigella sativa*. *Pakistan Journal of Medicine Research*, 41(2), 77-83.
29. Ustun, Z. (2015). PhD Thesis. Soğuk pres çörek otu tohumu yağının fizikokimyasal özelliklerinin korunması ve katma değerli ürün tasarımı. Department of Chemistry, Institute of Science and Technology, Selçuk University, Konya, Türkiye.
30. Sultan, M.T., Butt, M.S., Anjum, F.M., Jamil, A., Akhtar, S., Nasir, M. (2009). Nutritional profile of indigenous cultivar of black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil. *Pakistan Journal of Botany*, 41(3), 1321-1330.
31. Morikawa, T., Xu, F., Ninomiya, K., Matsuda, H., Yoshikawa, M. (2004). Nigellamines A3, A4, A5, and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism-promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(4), 494-497. [\[CrossRef\]](#)
32. Parveen, A., Farooq, M.A., Kyunn, W.W. (2020). A new oleanane type saponin from the aerial parts of *Nigella sativa* with anti-oxidant and anti-diabetic potential. *Molecules*, 25(9), 2171-2184. [\[CrossRef\]](#)
33. Wu, A.G., Zeng, W., Wong, V.K.W., Zhu, Y.Z., Lo, A.C., Liu, L., Law, B.Y.K. (2017). Hederagenin and α -hederin promote degradation of proteins in neurodegenerative diseases and improve motor deficits in MPTP-mice. *Pharmacological Research*, 115, 25-44. [\[CrossRef\]](#)
34. Alabdallat, N.G., Alanazi, H. (2023). Antioxidant properties of methanolic and acetone extracts of *Pictacia palaestina*, *Verbena triphylla* and *Nigella sativum*. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care*, 15(3), 262-266. [\[CrossRef\]](#)
35. Albakry, Z., Karrar, E., Mohamed Ahmed, I.A., Ali, A.A., Al-Maqtari, Q.A., Zhang, H., Wu, G., Wang, X. (2023). A comparative study of black cumin seed (*Nigella sativa* L.) oils extracted with supercritical fluids and conventional extraction methods. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(3), 2429-2441. [\[CrossRef\]](#)
36. Benazzouz-smail, L., Achat, S., Brahmi, F., Bachir-bey, M., Arab, R., Lorenzo, J.M., Benbouriche, A., Boudiab, K., Hauchard, D., Boulekbache, L., Madani, K. (2023). Biological properties, phenolic profile, and botanical aspect of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. seeds: A comparative study. *Molecules*, 28(2), 571-593. [\[CrossRef\]](#)
37. Chung, K.X., Wei, P.L.Y., Akowuah, G.A. (2023). Comparison of different extraction methods to determine thymoquinone contents in the seed of *Nigella sativa* L. and evaluation of its DPPH radical scavenging activity. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 17, 63-64.
38. Erdogan, U., Ozmen, O., Ozer, M. (2023). Wound healing, anti-analgesic, and antioxidant activity of *Nigella sativa* Linn., essential based topical formulations in rat model experimental skin defects. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 26(1), 45-60. [\[CrossRef\]](#)
39. Gueffai, A., Gonzalez-serrano, D.J., Christodoulou, M.C., Orellana-palacios, J.C., Ortega, M.L.S., Ouldoumna, A., Kiari, F.Z., Ioannou, G.D., Kapnissi-Christodoulou, C.P., Moreno, A., Hadidi, M. (2022). Phenolics from defatted black cumin seeds (*Nigella sativa* L.): Ultrasound-assisted extraction optimization, comparison, and antioxidant activity. *Biomolecules*, 12(9), 1311-1325. [\[CrossRef\]](#)
40. Sakib, R., Caruso, F., Aktar, S., Belli, S., Kaur, S., Hernandez, M., Rossi, M. (2023). Antioxidant properties of thymoquinone, thymohydroquinone and black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil: Scavenging of superoxide radical studied using cyclic voltammetry, dft and single crystal x-ray diffraction. *Antioxidants*, 12(3), 607-624. [\[CrossRef\]](#)

41. Tiji, S., Benayad, O., Berrabah, M., El Mounsi, I., Mimouni, M. (2021). Phytochemical profile and antioxidant activity of *Nigella sativa* L. growing in Morocco. *The Scientific World Journal*, 2021, 1-12. [\[CrossRef\]](#)
42. Al-Niaini, A.I., Sulaiman, N.A., Salim, H.A., Al-tae, F.G.A. (2023). Histopathological evaluation of the effect of *Salvadora persica* and *Nigella sativa* on the healing of tooth extraction socket in animal. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, 22, e238671, 1-12. [\[CrossRef\]](#)
43. Aremu, A., Idris, J.F., Akorede, G.J., Olatumji, A.O., Basiru, A., Ahmed, A.O. (2023). *Lawsonia inermis* possesses a significant analgesic activity compared to *Waltheria indica*, *Moringa oleifera*, *Nigella sativa*, and diclofenac in female Wistar rats. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 15(2), 48-55. [\[CrossRef\]](#)
44. Afshar, A.A., Toopchizadeh, V., Dolatkah, N., Jahanjou, F., Farshbaf-khalili, A. (2023). The efficacy of *Nigella sativa* L. oil on serum biomarkers of inflammation and oxidative stress and quality of life in patients with knee osteoarthritis: A parallel triple-arm double-blind randomized controlled trial. *Food Science & Nutrition*, 9(9), 7910-7920. [\[CrossRef\]](#)
45. Huseini, H.F., Mohtashami, R., Sadeghzadeh, E., Shadmanfar, S., Hashem-dabaghian, F., Kianbakht, S. (2022). Efficacy and safety of oral *Nigella sativa* oil for symptomatic treatment of knee osteoarthritis: A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 49, 101666, 1-7. [\[CrossRef\]](#)
46. Shaheen, N., Azam, A., Ganguly, A., Anwar, S., Parver, M.S.A., Punyamurtula, U., Hasan, M.K. (2022). Anti-inflammatory and analgesic activities of black cumin (BC, *Nigella sativa* L.) extracts in *in vivo* model systems. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1), 26, 1-8. [\[CrossRef\]](#)
47. Gul, R., Tansuker, H.D., Cengiz, A.B., Gul, M., Tabaru, A., Emre, F., Oktay, M.F. (2023). Effects of *Nigella sativa* oil on allergic rhinitis: An experimental animal study. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 88, 148-155. [\[CrossRef\]](#)
48. Liao, C., Han, Y., Chen, Z., Baigude, H. (2021). The extract of black cumin, licorice, anise, and black tea alleviates OVA-induced allergic rhinitis in mouse via balancing activity of helper T cells in lung. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 17(1), 1-14. [\[CrossRef\]](#)
49. Barlianto, W., Wulandari, D., Chusniyah, M., Kusuma, H.M.S., Prawiro, S.R. (2018). Improvement of Th17/Treg balance and asthma control test score by *Nigella sativa* supplementation in asthmatic children: A new approach to managing asthma. *Turkish Journal of Immunology*, 6(1), 1-7.
50. Koshak, A., Wei, L., Koshak, E., Wali, S., Alamoui, O., Demerdash, A., Qutub, M., Pushparaj, P.N., Heinrich, M. (2017). *Nigella sativa* supplementation improves asthma control and biomarkers: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Phytotherapy Research*, 31(3), 403-409. [\[CrossRef\]](#)
51. Salem, A.M., Bamosa, A.O., Qutub, H.O., Gupta, R.K., Badar, A., Elnour, A., Afzal, M.N. (2017). Effect of *Nigella sativa* supplementation on lung function and inflammatory mediators in partly controlled asthma: A randomized controlled trial. *Annals of Saudi Medicine*, 37(1), 64-71. [\[CrossRef\]](#)
52. Li, H., Dasilva, N.A., Liu, W., Xu, J., Dombi, G.W., Dain, J.A., Li, D., Chamcheu, J.C., Seeram, N.P., Ma, H. (2020). Thymocid®, a standardized black cumin (*Nigella sativa*) seed extract, modulates collagen cross-linking, collagenase and elastase activities, and melanogenesis in murine B16F10 melanoma cells. *Nutrients*, 12(7), e2146, 1-16. [\[CrossRef\]](#)
53. Shahroudi, M.J., Mehri, S., Hosseinzadeh, H. (2017). Anti-aging effect of *Nigella sativa* fixed oil on D-galactose-induced aging in mice. *Journal of Pharmacopuncture*, 20(1), 29-35.
54. Rossi, A., Priolo, L., Iorio, A., Vescarelli, E., Gerardi, M., Campo, D., Nunno, D.D., Ceccarelli, S., Angeloni, A., Marchese, C. (2013). Evaluation of a therapeutic alternative for telogen effluvium: A pilot study. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 3(3A1), 9-16. [\[CrossRef\]](#)
55. Saleem, U., Sabir, S., Ahmad, B. (2017). Protective role of *Nigella sativa* in chemotherapy-induced alopecia. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(4), 455-462. [\[CrossRef\]](#)
56. Al-griw, M.A., Shalabi, S.M., Alghazeer, R.O., Elnfati, A.H., Treesh, S.A., Benjama, A.E. Shamlan, G., Habibullah, M.M., Eskandrani, A.A., Alnajeebi, A.M., Babteen, N.A., Alansari, W.S. (2023). *Nigella sativa* oil alleviates mouse testis and sperm abnormalities induced by BPA potentially through redox homeostasis. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 26(2), 301-312. [\[CrossRef\]](#)
57. Almujaaydil, M.S., Algheshairy, R.M., Alhomaid, R.M., Alharbi, H.F., Ali, H.A. (2023). *Nigella sativa*-floral honey and multi-floral honey versus *Nigella sativa* oil against testicular degeneration rat model: The possible protective mechanisms. *Nutrients*, 15(7), 1-17. [\[CrossRef\]](#)
58. Khani, S., Abdollah, M., Khalaj, A., Heidari, H., Zohali, S. (2021). The effect of hydroalcoholic extract of *Nigella sativa* seed on dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovarian syndrome in rats: An experimental study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 19(3), 271-282. [\[CrossRef\]](#)

59. Ansari, V., Mujahid, M.D., Siddiqui, H., Dixit, R., Singh, K. (2016). *In vitro* study for antiplatelet activity of 'Kalonji' (*Nigella sativa*) extracts using aspirin as standard. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(1), 182-185.
60. Islam, M.T., Molla, S., Das, A.K., Zaman, F., Khan, R. (2019). *In vitro* anti-atherothrombosis activity of *Nigella sativa* oil, phytol and their combinations. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 53(4), 670-674. [CrossRef]
61. Yusof, A.N.J.M. (2017). Screening of haemostatic activity of *Nigella sativa* seed extract. *Journal of Engineering and Health Sciences*, 1(1), 57-74.
62. Shoaie-hagh, P., Kafi, F.K., Najafi, S., Zamanzadeh, M., Bakavoli, A.H., Ramezani, J., Soltanian, S., Asili, J., Hosseinzadeh, H., Eslami, S., Taherzadeh, Z. (2021). A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial to evaluate the benefits of *Nigella sativa* seeds oil in reducing cardiovascular risks in hypertensive patients. *Phytotherapy Research*, 35(8), 4388-4400. [CrossRef]
63. Akansha, Kaushal, S., Arora, A., Heena, Sharma, P., Jangra, R. (2023). Chemical composition and synergistic antifungal potential of *Nigella sativa* L. seeds and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM perry buds essential oils and their major compounds, and associated molecular docking studies. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 26(3), 602-625. [CrossRef]
64. Kiran, A., Muti-ur-rehman, K., Asim, A., Aqeel, J., Rizwan, Q., Farooq, Y., Farkhanda, Y., Sohail, M.L., Sajid, U. (2018). *In vitro* antiviral activity of *Nigella sativa* against Peste des Petits Ruminants (PPR) virus. *Pakistan Journal of Zoology*, 50(6), 2224-2228. [CrossRef]
65. Kolayli, S., Kazaz, G., Ozkok, A., Keskin, M., Kara, Y., Kanbur, E.D., Erturk, O. (2023). The phenolic composition, aroma compounds, physicochemical and antimicrobial properties of *Nigella sativa* L.(black cumin) honey. *European Food Research and Technology*, 249(3), 653-664. [CrossRef]
66. Umar, S., Munir, M.T., Subhan, S., Azam, T., Nisa, Q., Khan, M.I., Umar, W., Rehman, Z., Saqip. A.S., Shah, M.A. (2016). Protective and antiviral activities of *Nigella sativa* against avian influenza (H₉N₂) in turkeys. *Journal of Saudi Society of Agricultural Sciences*, 10, 1-7.
67. Beg, Z.A., Roohi, N., Iqbal, Z., Iqbal, M.A., Zulfiqar, A. (2023). Role of herbs as anthelmintic in controlling parascariasis in equines. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 33(1), 235-240. [CrossRef]
68. Sujavanthi, L., Thayalini, T., Mikunthan, G. (2023). Phytochemical screening and anthelmintic activity of four plant extracts on earthworm, *Eisenia fetida*. *Proceedings of 10th Ruhuna International Science & Technology Conference RISCOON 2023*, 24.
69. Arazmjoo, S., Es-Haghi, A., Mahmoodzadeh, H. (2021). Evaluation of anti-cancer and antioxidant properties of nanoemulsions synthesized by *Nigella sativa* L. tincture. *Nanomedicine Journal*, 8(1), 57-64.
70. Baig, W.A., Alwosaibai, K., Al-jubran, K.M., Chaudhry, T.M., Al-dowish, N., Alsaffar, F., Alam, M.A. (2022). Synergistic anti-cancer effects of *Nigella sativa* seed oil and conventional cytotoxic agent against human breast cancer. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*, 37(3), 315-321. [CrossRef]
71. Kumari, P., Dang, S. (2023). Evaluation of enhanced cytotoxicity effect of repurposed drug simvastatin/thymoquinone combination against breast cancer cell line. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 22(1), 1-14. [CrossRef]
72. Reddy, Y.P., Chandrasekhar, K.B., Sadiq, M.J. (2015). A study of *Nigella sativa* induced growth inhibition of MCF and HepG2 cell lines: An anti-neoplastic study along with its mechanism of action. *Pharmacognosy Research*, 7(2), 193-197. [CrossRef]
73. Tendulkar, S., Hattiholi, A., Dodaman, S. (2023). In-silico analysis of thymoquinone as an anti-cancer agent against chemoresistance-associated proteins in ovarian cancer. *Journal of Advanced Scientific Research*, 14(6), 36-44. [CrossRef]
74. Khan, S.Z., Subhani, G., Vaseem, A., Sadiq, N., Mohsin, M. (2023). Experimental evaluation of anti-ulcer potential of *Nigella sativa* oil in gastric ulcers in albino rats. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 17(1), 10-15. [CrossRef]
75. Paseban, M., Niazmand, S., Soukhtanloo, M., Meybodi, N.T. (2020). The preventive effect of *Nigella sativa* seed on gastric ulcer induced by indomethacin in rat. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 9(1), 12-19. [CrossRef]
76. Babaei, M., Akbari, G., Shahbazfar, A.A. (2020). Histopathological effects of oral administration of *Nigella sativa* hydroalcoholic extract on rat digestive tract. *Payavard Salamat*, 14(3), 275-283.
77. Tariq, E., Sohaib, A.U., Asif, M., Munir, A.B., Akbar, J., Saleem, I., Hafeez, K. (2023). Antidiarrheal activity of methanolic extract of *Nigella sativa* seeds in rodents. *Journal of Xi'an Shiyou University, Natural Science Edition*, 19, 769-780. Retrieved October 15, 2024, from <https://www.xisdxjsu.asia/V19I05-63.pdf>. Accessed date: 15.02.2024.

78. Tayman, C., Cekmez, F., Kafa, I.M., Canpolat, F.E., Cetinkaya, M., Uysal, S., Tunc, T., Sarici, S.U. (2012). Beneficial effects of *Nigella sativa* oil on intestinal damage in necrotizing enterocolitis. *Journal of Investigative Surgery*, 25(5), 286-294. [\[CrossRef\]](#)
79. Khan, S.S., Zaidii, K.U. (2023). Protective effect of *Nigella sativa* seed extract and its bioactive compound thymoquinone on streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 22(1), 51-59. [\[CrossRef\]](#)
80. Mushtaq, A., Aslam, B., Muhammad, F., Khan, J.A. (2021). Hepatoprotective activity of *Nigella sativa* and *Piper nigrum* against concanavalin a-induced acute liver injury in mouse model. *Pakistan Veterinary Journal*, 41(1), 78-84. [\[CrossRef\]](#)
81. Shrivastava, A.K., Shrestha, L., Pokhrel, B.R., Joshi, B., Lamichhane, G., Vidović, B., Koirala, N. (2023). LC-MS based metabolite profiling, *in-vitro* antioxidant and *in-vivo* antihyperlipidemic activity of *Nigella sativa* extract. *eFood*, 4(4), e107, 1-19. [\[CrossRef\]](#)
82. Jangjo-borazjani, S., Dastgheib, M., Kiyamarsi, E., Jamshidi, R., Rahmati-ahmadabad, S., Helalizadeh, M., Iraj, R., Cornish, S.M., Mohammadi-darestani, S., Khojasteh, Z., Azarbayjani, M.A. (2023). Effects of resistance training and *Nigella sativa* on type 2 diabetes: Implications for metabolic markers, low-grade inflammation and liver enzyme production. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 129(4), 913-921. [\[CrossRef\]](#)
83. Javaheri, J., Asgari, M., Ghafarzagdegan, R. (2023). The effect of *Nigella sativa* powder on blood sugar and lipid profiles in type 2 diabetic patients. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 18(2), e135757, 1-8. [\[CrossRef\]](#)
84. Ansari, Z.M., Nasiruddin, M., Khan, R.A., Haque, S.F. (2017). Protective role of *Nigella sativa* in diabetic nephropathy: A randomized clinical trial. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 28(1), 9-14.
85. Canayakin, D., Bayir, Y., Baygutalp, N.K., Karaoglan, E.S., Atmaca, H.T., Ozgeris, F.B.K., Keles, M.S., Halici, Z. (2016). Paracetamol-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats: The protective role of *Nigella sativa*. *Pharmaceutical Biology*, 54(10), 2082-2091. [\[CrossRef\]](#)
86. Hosseinian, S., Rad, A.K., Hadjzadeh, M.R., Roshan, N.M., Havakhah, S., Shafiee, S. (2016). The protective effect of *Nigella sativa* against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 6(1), 44-54.
87. Aboul-ezz, H.S., Khadrawy, Y.A., Noor, N.A. (2011). The neuroprotective effect of curcumin and *Nigella sativa* oil against oxidative stress in the pilocarpine model of epilepsy: A comparison with valproate. *Neurochemical Research*, 36, 2195-2204. [\[CrossRef\]](#)
88. Alhebshi, A.H., Gotoh, M., Suzuki, I. (2013). Thymoquinone protects cultured rat primary neurons against amyloid β -induced neurotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 433(4), 362-367. [\[CrossRef\]](#)
89. Alhebshi, A.H., Odawara, A., Gotoh, M., Suzuki, I. (2014). Thymoquinone protects cultured hippocampal and human induced pluripotent stem cells-derived neurons against α -synuclein-induced synapse damage. *Neuroscience Letters*, 570, 126-131. [\[CrossRef\]](#)
90. Islam, M.H., Ahmad, I.Z., Salman, M.T. (2015). Neuroprotective effects of *Nigella sativa* extracts during germination on central nervous system. *Pharmacognosy Magazine*, 11(1), 182-189.
91. Perveen, T., Haider, S., Kanwal, S., Haleem, D.J. (2009). Repeated administration of *Nigella sativa* decreases 5-HT turnover and produces anxiolytic effects in rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(2), 139-144.
92. Zribi, I., Omezzine, F., Haouala, R. (2014). Variation in phytochemical constituents and allelopathic potential of *Nigella sativa* with developmental stages. *South African Journal of Botany*, 94, 255-262. [\[CrossRef\]](#)
93. Zribi, I., Ghezal, N., Sbai, H., Richard, G., Fauconnier, M.L., Haouala, R. (2019). Biochemical composition of Tunisian *Nigella sativa* L. at different growth stages and assessment of the phytotoxic potential of its organic fractions. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153(2), 205-212. [\[CrossRef\]](#)



PHARMACIST INTERVENTIONS TO IMPROVE CLINICAL OUTCOMES IN HEART FAILURE

KALP YETERSİZLİĞİNDE KLİNİK SONUÇLARI İYİLEŞTİRMEYE YÖNELİK ECZACI MÜDAHALELERİ

Yeşim BULUT^{1,2*} , Muhammed Yunus BEKTAY³ 

¹Bezmialem Vakif University, Institute of Health Sciences, Department of Clinical Pharmacy, 34093, İstanbul, Türkiye

²Bezmialem Vakif University, Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Pharmacy, 34093, İstanbul, Türkiye

³Istanbul University-Cerrahpasa, Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Pharmacy, 34500, İstanbul, Türkiye

ABSTRACT

Objective: Heart failure (HF) is associated with poor outcomes, such as high mortality and hospitalization rates, and impaired quality of life (QoL). Pharmacist participations in a multidisciplinary care team have demonstrated to be beneficial in HF, which includes optimization of guideline-directed medical therapy (GDMT) and medication adjustment, optimizing the transition of care (ToC) and medication reconciliation, and providing patient education. The aim of this literature review is to investigate the impact of pharmacist interventions on HF, with the intention to improve clinical outcomes.

Result and Discussion: Randomized controlled trials evaluating the efficacy of pharmacist intervention in HF patients were reviewed, and 8 randomized controlled trials were included. The pharmacist interventions that were investigated in these studies were medication review, patient counseling, and patient education. The included studies demonstrated that pharmacist interventions may reduce prescribing errors, medication discrepancies, and drug-drug interactions (DDIs). Studies demonstrated that patient counseling and education provided by the pharmacist may improve QoL and patient knowledge in HF. The rest of the outcomes lacked significance. In order to develop this issue further, large-scale randomized controlled trials and large-scale meta-analyses should be conducted involving pharmacist interventions in HF.

Keywords: Clinical pharmacist, heart failure, pharmaceutical care, pharmacist intervention

ÖZ

Amaç: Kalp yetersizliği (KY), yüksek mortalite ve hastaneye yatış oranları ve bozulmuş yaşam kalitesi gibi kötü sonuçlarla ilişkilendirilmiştir. Kılavuza yönelik tıbbi tedavi optimizasyonu ve ilaç düzenlemesi, bakım geçişi ve ilaç uzlaşısı, ve hasta eğitiminin sağlanmasını içeren multidisipliner bir bakım ekibinin içinde eczacı katkılarının KY'de faydalı olduğu gösterilmiştir. Bu literatür taramasının amacı, klinik sonuçları iyileştirmek amacıyla eczacı müdahalelerinin KY üzerindeki etkisini araştırmaktır.

Sonuç ve Tartışma: Kalp yetersizliği hastalarında eczacı müdahalelerinin etkinliğini değerlendiren randomize kontrollü çalışmalar taranmış ve 8 randomize kontrollü çalışma

* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Yeşim Bulut
e-mail / e-posta: yesimbulut92@gmail.com, Phone / Tel.: +905319321071

derlenmiştir. Bu çalışmalarda araştırılan eczacı müdahaleleri ilaç incelemesi, hasta danışmanlığı ve hasta eğitimidir. Derlenen çalışmalar, eczacı müdahalelerinin reçeteleme hatalarını, ilaç uyumsuzluklarını ve ilaç-ilaç etkileşimlerini azaltabileceğini göstermiştir. Çalışmalar, eczacı tarafından sağlanan hasta danışmanlığı ve eğitiminin KY'de yaşam kalitesini ve hastanın bilgisini arttırabileceğini göstermiştir. Diğer sonuçlarda anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu konunun daha da geliştirilmesi için kalp yetersizliğinde eczacı müdahalelerini içeren geniş ölçekli randomize kontrollü çalışmalar ve meta-analizler yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: *Eczacı müdahaleleri, farmasötik bakım, kalp yetersizliği, klinik eczacı*

INTRODUCTION

According to the European Society of Cardiology (ESC), heart failure (HF) is defined as a clinical syndrome of the heart that is characterized by a series of cardinal symptoms, such as dyspnea (shortness of breath), fatigue, and swelling at the ankles, which is caused by a functional or/and structural anomaly that leads to an insufficient cardiac output at rest or/and during exercise [1]. In addition, the American Heart Association/American College of Cardiology (AHA/ACC) defines HF as a complex syndrome with accompanying symptoms and signs that result from abnormalities of ejection or filling of blood to the ventricles of the heart [2]. It is difficult to define a specific reason for the development of HF, since multiple factors and comorbidities often exist, and contribute to the disease pathogenesis. The risk factors accompanying HF may include cardiovascular risk factors, such as coronary heart disease, hypertension, obesity, diabetes mellitus, and smoking; inflammation, and socioeconomic levels, which contribute to left or right ventricular dysfunction [3].

HF has characteristic symptoms, which include dyspnea and fatigue, with the presence of cardiac dysfunction. Some HF patients also show physical signs caused by fluid retention, which is an outcome of decreased cardiac output that results in activation of sympathetic nervous system with renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). Activation of the RAAS causes water and sodium retention, leading to fluid accumulation. The typical symptoms that fluid buildup may cause include dyspnea, orthopnea, edema, abdominal discomfort and distension, and hepatic congestion, while symptoms caused by reduction in cardiac output include fatigue and weakness [4].

It is predicted that the total population with HF worldwide is 64.3 million, and with more than half is estimated to have a preserved left ventricular ejection fraction (LVEF). The estimated prevalence of HF in developed countries is equal to 1% to 2% of their adult population[3]. HF is seen primarily in older people, especially individuals aged over 60 years [5]. Furthermore, for individuals aged >60 years, HF is the most common cardiovascular reason for hospitalization [6].

The prognosis and the outcomes of HF have improved over the past three decades. However, the outcomes of HF still remain poor today [3]. According to a 2018 study, 5-year mortality between 1990 and 2009 was 67% in HF with reduced ejection fraction (HFrEF) and HF with preserved ejection fraction (HFpEF). HFrEF and HFpEF subtypes showed similar mortality rates [7]. Additionally, a 2017 study reported a median survival of 2.1 years between 2005 and 2009, and 5-year mortality rates for HFrEF and HFpEF were 75.3% and 75.7%, respectively [8].

Hospitalizations in HF is an important indicator for the prognosis of the disease, and the average incidence of hospitalization after HF diagnosis is once a year. Moreover, HF holds the highest 30-day readmission rate with 20-25% among other diseases. Nearly half of HF patients will be hospitalized within one year after the initial diagnosis, and 20% of them will be rehospitalized within the same year [3]. It is suggested that after hospitalization, long-term survival for HF patients may be poor [8]. Patients with HF often experience physical discomfort and emotional distress that significantly impairs their quality of life (QoL) as the disease progresses [9]. In addition to the worsening physical deterioration due to the progressive nature of the disease, patients with advanced HF often undergo social impairment and psychological problems like depression and anxiety [10].

Because HF is a heterogeneous syndrome, patients often have numerous comorbidities that may conclude in complex treatment regimens, medication nonadherences, and harmful drug-drug interactions [11]. After hospital discharge, it is also very crucial to optimize the transition of care (ToC) from the hospital setting to home, provide patient counseling and education, ensure that appropriate

medications are administered according to current guidelines, and ensure patient adherence to the therapy. However, each and every element may be challenging to accomplish, resulting in failure in treatment and disease management. Pharmacist may take proactive role in HF by using cognitive pharmacy services, such as medication review and patient counseling [12].

Medication review may be defined as the evaluation of patient's medications to optimize their therapy plan with the aim of improving health related outcomes. Within this practice, pharmacists review patient's prescription to address contradictions or changed drugs and address patient's medication administration to improve their knowledge on medication and to enhance their adherence [13]. It is suggested that as a member of the multidisciplinary care team, the pharmacist may improve patient care by medication review, identifying potentially harmful prescribed drugs, optimizing the patient's treatment plan according to current guidelines and ensuring that the necessary medications are prescribed. In a retrospective study of 378 hospitalized HF patients with worsening symptoms between 2012 and 2014, pharmacist-led medication adjustment significantly reduced inappropriate medication use [14].

Patient counseling may be defined as giving written or verbal information to patients about how to use their medication, its possible side effects, proper storage of the medication, and diet and lifestyle changes. As important parts of the pharmacist intervention, patient counseling and education promote the rational use of medications, which has the potential to enhance disease outcomes and medication adherence [15]. In a meta-analysis of 49 randomized controlled trials, pharmacist counseling was associated with decreases in 30-day hospital readmissions and emergency hospital visits, and a significant increase in medication adherence compared to no counseling [16].

According to the guidelines on good pharmacy practice from the International Pharmaceutical Federation/World Health Organization (FIP/WHO), pharmacists should provide recommendations to make sure that the patient receives adequate information, written or verbally, to maximize the treatment benefit [17]. A variety of interdisciplinary HF care programs include patient counseling and education to enhance the benefits patients derive from the medication therapy by individualizing care plans, providing information on the medication, and improving the knowledge on the disease and self-care. So, patient counseling and education comprise an important part of the pharmacist intervention services [18].

Pharmacist participations in a multidisciplinary care team have demonstrated to be beneficial in HF management, which includes optimization of guideline-directed medical therapy (GDMT) and medication adjustment [14] optimizing the transition of care (ToC) and medication reconciliation [19,20], and providing patient education [21]. Figure 1 summarizes these pharmacist involvements in HF management.

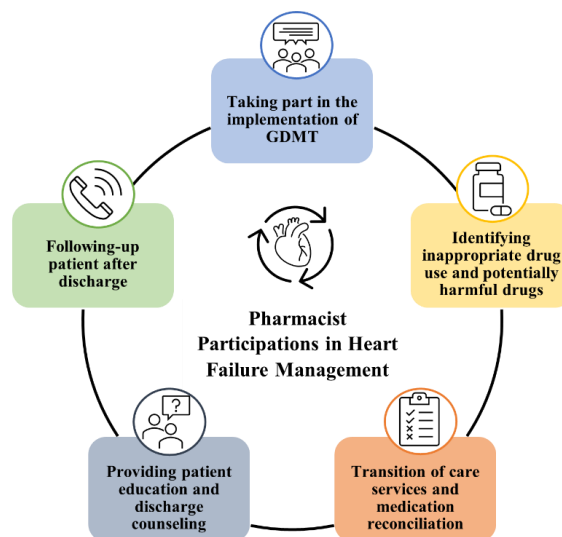


Figure 1. Pharmacist participations in HF management

Further, previous studies have shown that pharmacist contributions in HF management in a multidisciplinary team may reduce HF hospitalizations [22] and 30-day all-cause readmission rates [23].

The aim of this study is to review the available literature to investigate the impact of pharmacist interventions on HF, with the intention to improve clinical outcomes.

RESULT AND DISCUSSION

This study is designed as a literature review, English studies about the pharmacist's participation in HF care between the years 2010-2022 were screened. During the literature search, clinical studies were searched with the keywords "HF, clinical pharmacist, pharmaceutical care, drug-related problems, pharmacist intervention" in Pubmed®, Scopus®, Webofscience®, and Google Scholar® search engines. Animal studies and experimental models were excluded. The last screening was made on 20 February 2023.

Randomized controlled trials and meta-analyses evaluating the efficacy of pharmacist intervention in HF patients were reviewed. Only the studies that were available in full text are included. The data obtained from the studies are as follows: the characteristics of the people participating in the study (age, HF classification; the type, duration, frequency of pharmacist intervention; type of outcome measure (quality of life, medication adherence, all-cause and HF related hospitalization, length of hospital stay, prescription errors and medication discrepancies, all-cause and HF related mortality).

A total of 8 randomized controlled trials conducted to determine the benefit of pharmacist interventions in HF are included in this study [24-31]. The characteristics of the included trials are summarized in Table 1, which follows: the total number of participants, the environment that the intervention took place in, follow-up time, pharmacist intervention, and outcome measure. The main pharmacist intervention practices that were investigated in these studies include medication review, patient counseling, and patient education.

Table 1. Characteristics of the included studies

Study	Participants	Intervention Setting	Follow-up Time	Pharmacist Intervention	Outcome Measure
Yassin et al.[24]	93 CHF* patients with NYHA** class II or III, 47 in intervention group, 46 in usual care group	Hospital	6 weeks	Medication review, patient counseling	Hospitalization, length of hospital stay, medication discrepancies
Schulz et al. [25]	237 CHF patients, 110 in intervention group, 127 in usual care group	Community pharmacy	Median follow-up: 2.0 years	Medication review, patient counseling	Medication adherence, QoL***, hospitalization, all-cause mortality
Roblek et al. [26]	51 HF**** patients, 26 in intervention group, 25 in usual care group	Hospital	6 months	Recommendations on clinically relevant DDIs*****	Number of clinically relevant DDIs at discharge, all-cause mortality, hospitalization
Vinluan et al. [27]	16 HF patients aged ≥65 years, 7 in intervention group, 9 in usual care group	Hospital	Four times total: at day 3, 30, 60 and 90	Patient counseling	HF rehospitalization, medication adherence, mortality

Table 1 (continued). Characteristics of the included studies

Study	Participants	Intervention Setting	Follow-up Time	Pharmacist Intervention	Outcome Measure
Barker et al. [28]	120 hospitalized CHF patients, 64 in intervention group, 56 in usual care group	Home	Two times total: 1 and 6 months after discharge	Medication review	Mortality, CHF and all-cause hospitalizations, health related QoL
Lowrie et al. [29]	2164 HF patients with left ventricular systolic dysfunction, 1090 in intervention group, 1074 in usual care group.	Within National Health Service	Median follow-up: 4.7 years	Medication review	All-cause mortality, HF hospitalization, CV hospitalization, all-cause hospitalization
Korajkic et al. [30]	70 HF patients, 35 in intervention group, 35 in usual care group	Outpatient clinic	Three times total: at week 4, 8 and 12	Patient education	Number of correct weight-titrated furosemide dose adjustments, HF rehospitalization for fluid overload, HF-related QoL, HF knowledge
Eggink et al. [31]	85 HF patients, 41 in intervention group, 44 in usual care group	Hospital	6 weeks	Medication review	Total sum of prescription errors and medication discrepancies, estimated adherence

*CHF: Chronic heart failure, **NYHA: New York Heart Association, ***QoL: Quality of life, ****HF: Heart failure, *****DDIs: Drug-drug interactions

Yassin et al. conducted a study with chronic heart failure (CHF) patients in Iraq, to evaluate the role of medication review and patient counseling provided by a clinical pharmacist in the management of HF care. Patient's medications were reviewed by a clinical pharmacist to identify and resolve any prescribing errors. The counseling included an interview with the patient to provide information about how HF medications work, side effects, appropriate route of administration, and dosing frequency. Pharmacist interventions resulted in significant reductions in hospitalization and length of hospital stay. Additionally, significant reductions in medication discrepancies were observed, which were: incorrect dosing, discontinuation of prescribed medication, and restarting discontinued medication [24].

In a German study investigating the benefit of medication review and patient counseling provided by a pharmacist in a multidisciplinary team on hospitalizations, QoL, medication adherence, and all-cause mortality in chronic HF patients, pharmacist participations caused a significant increase in medication adherence to the three HF drug classes (beta blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors [ACEi] or angiotensin receptor blockers [ARBs], and mineralocorticoid receptor antagonists [MRAs]), which were the recommended drugs of choice according to the guidelines at that time. Pharmacist participations also led to improvement in the QoL of the HF patients. The results did not show a significant difference in hospitalizations and all-cause mortality [25].

In a study with HF patients in Slovenia, pharmacist's effect on reducing clinically relevant drug-drug interactions (DDIs) was evaluated. At discharge, pharmacist contributions caused a significant reduction in clinically relevant drug-drug interactions. The most common clinically relevant DDIs include the interaction between ACEi/ARBs and spironolactone, which caused hyperkalemia, renal impairment, and arrhythmia; and the interaction between loop diuretics and spironolactone, which led to renal impairment, hypovolemia, and electrolyte imbalance. The results showed no significant

difference in hospitalization and all-cause mortality [26].

An American study conducted to assess the benefit of pharmacist patient counseling on therapy adherence in HF. Pharmacists provided inpatient counseling on pathogenesis and symptoms of the disease, medication therapy, possible side effects, necessary diet and lifestyle changes, weight monitoring, and when to seek help, and followed up patients via phone after discharge. The data demonstrated a higher medication adherence in the intervention group at day 3, 30, and 60 compared with the control group. At day 90, the data showed a reduction in medication adherence in both groups, and the adherence in the intervention group was lower compared to the control group. After the overall follow-up period, hospital readmissions were not significantly different. However, mortality rates were lower in the intervention group [27].

Barker et al. conducted a study with chronic HF patients to determine the impact of medication review led by pharmacist on HF outcomes in Australia. In the study, pharmacist participations did not cause a significant difference in mortality, hospital admissions, and health related QoL [28]. Similarly, in a study with HF patients with left ventricular systolic dysfunction in the UK, medication review provided by a pharmacist did not cause a significant difference in all-cause mortality, all-cause, HF, and cardiovascular related hospitalizations [29].

The impact of patient education on patient-guided diuretic dose adjustment in HF was investigated in Australia with HF patients receiving furosemide diuretic therapy. The pharmacist intervention consisted of an educational session about HF and HF medications, improving patients' self care, how to recognize fluid retention symptoms, daily weight measurement, and adjusting the furosemide dose according to the changes in their signs and symptoms. Pharmacist interventions resulted in significantly higher appropriate self-adjustments of furosemide dosing. Without the pharmacist intervention, the number of patients readmitted to the hospital due to fluid overload was significantly higher. Moreover, the interventions resulted in significantly improved HF knowledge and the HF-related QoL [30].

In a study in the Netherlands, the effect of discharge medication review provided by a clinical pharmacist in HF was investigated. Patients' discharge medication was reviewed by a clinical pharmacist to identify any discrepancies and prescription errors. Medication discrepancies included deflections in medication use, such as discontinuation of prescribed medication, restarting discontinued medication, incorrect dosing, and incorrect time of taking medication. Prescription errors included errors that occurred during prescribing, such as dosage form errors, contraindications, and medication duplications. The most common problem identified was prescription errors. Subsequently, discontinuation of prescribed medication and incorrect dosing were common for the intervention group. After the pharmacist intervention, prescription errors or medication discrepancies was reduced. However, the results did not cause a significant difference in estimated adherence [31].

The included studies demonstrated that pharmacist interventions may reduce prescribing errors, medication discrepancies [24,31] and drug-drug interactions [26]. Additionally, studies demonstrated that patient counseling and education provided by the pharmacist may improve QoL [25,30] and patient knowledge in HF [30]. The rest of the outcomes lacked significance between the study group and the usual care group [25-29,31]. These findings may be caused by the heterogenous and progressive nature of HF. In addition to the chronic progression of HF over time, other comorbidities that HF patients often have contribute to the poor disease outcomes, which may be associated with poor survival rates, high hospitalization rates, and deterioration in QoL. It should be noted that since the publications of the included studies, guidelines for the treatment and management of HF have been updated and new treatment recommendations have been made that were shown to reduce the risk of HF hospitalization or cardiovascular death in randomized controlled trials [32]. This may also explain why the results in the included studies were not significantly different.

The lack of significance in outcomes do not indicate that pharmacist participations in HF care may not be beneficial. In a chronic disease such as HF that causes a burden on patients, quality of life is an outcome that should be focused on. Improvements in QoL may be achieved with pharmacists who are knowledgeable about the disease and patients' comorbidities, can evaluate patients' complex drug regimens and detect drug-related problems, know current treatment strategies, and provide effective patient education about drug use and the disease. Moreover, pharmacists are accessible healthcare providers, so it is convenient for patients to receive health care services from a more accessible source.

Compared with health care professionals such as physicians and nurses who have other duties and responsibilities, pharmacists may provide counseling and education in a patient-based manner for a longer period of time and alleviate the burden of other health care providers since interventions like medication review and patient counseling are pharmacist's responsibilities.

Study Limitations

There are several differences among the included randomized controlled trials that may prevent a general conclusion from being drawn. The included studies vary in terms of sample size, study period, sociodemographic characteristics of the participants, and disease severity. Some of the included studies had small sample sizes and short follow-up periods, which may affect the generalizability of the findings. The studies included HF patients from different countries, which could have affected the accessibility of the health services and the pharmacist intervention for each study. The HF severity of the patient population varied within some of the included studies between the control and intervention groups. This may have affected the accurate reflection of whether pharmacist interventions objectively improved clinical outcomes. For a better comparison, these elements should be equivalent in the participants.

Future Perspectives

Pharmacist participations in HF care have the potential to improve disease outcomes and alleviate the burden of the disease. In order to develop this issue further, large-scale randomized controlled trials and meta-analyses should be conducted involving pharmacist interventions in HF. The potential impact of pharmacist interventions should be investigated not only in the management of HF alone, but also in the presence of HF and different comorbidities. So, a more evidence-based approach can be taken in different scenarios accompanying HF.

Additionally, protocols for HF management should be established that include pharmacist interventions to improve disease outcomes, and disease management teams in which the pharmacist plays an active role should become widespread. Thus, clearer approaches can be created in medication review and patient counseling practices carried out by the pharmacist and can be made a regular practice.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Bezmialem Foundation University, Department of Clinical Pharmacy for their support.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: Y.B., M.Y.B.; Design: Y.B., M.Y.B.; Control: Y.B., M.Y.B.; Sources: Y.B., M.Y.B.; Materials: Y.B., M.Y.B.; Data Collection and/or Processing: Y.B., M.Y.B.; Analysis and/or Interpretation: Y.B., M.Y.B.; Literature Review: Y.B., M.Y.B.; Manuscript Writing: Y.B.; Critical Review: Y.B., M.Y.B.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

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

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

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

REFERENCES

1. McDonagh, T.A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R.S., Baumbach, A., Böhm, M., Burri, H., Butler, J., Čelutkienė, J., Chioncel, O., Cleland, J.G.F., Coats, A.J.S., Crespo-Leiro, M.G., Farmakis, D., Gilard, M., Heymans, S., Hoes, A.W., Jaarsma, T., Jankowska, E.A., Lainscak, M., Lam, C.S.P., Lyon, A.R., McMurray, J.J.V., Mebazaa, A., Mindham, R., Muneretto, C., Piepoli, M.F., Price, S., Rosano, G.M.C., Ruschitzka, F., Skibelund, A.K., ESC Scientific Document Group. (2021). Corrigendum to 2021 ESC

- Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC, *European Heart Journal*, 42(48), 4901. [CrossRef]
2. Heidenreich, P.A., Bozkurt, B., Aguilar, D., Allen, L.A., Byun, J.J., Colvin, M.M., Deswal, A., Drazner, M.H., Dunlay, S.M., Evers, L.R., Fang, J.C., Fedson, S.E., Fonarow, G.C., Hayek, S.S., Hernandez, A.F., Khazanie, P., Kittleson, M.M., Lee, C.S., Link, M.S., Milano, C.A., Yancy, C.W. (2022). 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the management of heart failure: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, 145(18), 895-1032. [CrossRef]
 3. Groenewegen, A., Rutten, F.H., Mosterd, A., Hoes, A.W. (2020). Epidemiology of heart failure. *European journal of heart failure*, 22(8), 1342-1356. [CrossRef]
 4. UpToDate Web site. (2024). Retrieved from <https://www.uptodate.com/>. Accessed date: 31.07.2024.
 5. van Riet, E.E., Hoes, A.W., Wagenaar, K.P., Limburg, A., Landman, M.A., Rutten, F.H. (2016). Epidemiology of heart failure: The prevalence of heart failure and ventricular dysfunction in older adults over time. A systematic review. *European Journal of Heart Failure*, 18(3), 242-252. [CrossRef]
 6. Rossignol, P., Hernandez, A.F., Solomon, S.D., Zannad, F. (2019). Heart failure drug treatment. *The Lancet*, 393(10175), 1034-1044. [CrossRef]
 7. Tsao, C.W., Lyass, A., Enserro, D., Larson, M.G., Ho, J.E., Kizer, J.R., Gottdiener, J.S., Psaty, B.M., Vasan, R.S. (2018). Temporal trends in the incidence of and mortality associated with heart failure with preserved and reduced ejection fraction. *JACC: Heart Failure*, 6(8), 678-685. [CrossRef]
 8. Shah, K.S., Xu, H., Matsouaka, R.A., Bhatt, D.L., Heidenreich, P.A., Hernandez, A.F., Devore, A.D., Yancy, C.W., Fonarow, G.C. (2017). Heart failure with preserved, borderline, and reduced ejection fraction: 5-Year outcomes. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(20), 2476-2486. [CrossRef]
 9. Doorenbos, A.Z., Levy, W.C., Curtis, J.R., Dougherty, C.M. (2016). An intervention to enhance goals-of-care communication between heart failure patients and heart failure providers. *Journal of Pain and Symptom Management*, 52(3), 353-360. [CrossRef]
 10. Braun, L.T., Grady, K.L., Kutner, J.S., Adler, E., Berlinger, N., Boss, R., Butler, J., Enguidanos, S., Friebert, S., Gardner, T.J., Higgins, P., Holloway, R., Konig, M., Meier, D., Morrissey, M.B., Quest, T.E., Wiegand, D.L., Coombs-Lee, B., Fitchett, G., Gupta, C., American Heart Association Advocacy Coordinating Committee. (2016). Palliative care and cardiovascular disease and stroke: A policy statement from the American Heart Association/American Stroke Association. *Circulation*, 134(11), e198-e225. [CrossRef]
 11. Arunmanakul, P., Kengkla, K., Chaiyasothi, T., Phrommintikul, A., Ruengorn, C., Permsuwan, U., Thakkinstian, A., Page, R.L., Munger, M.A., Nathisuwan, S., Chaiyakunapruk, N. (2021). Effects of pharmacist interventions on heart failure outcomes: A systematic review and meta-analysis. *JACCP: Journal of The American College of Clinical Pharmacy*, 4(7), 871-882. [CrossRef]
 12. Anderson, S.L., Marrs, J.C. (2018). A review of the role of the pharmacist in heart failure transition of care. *Advances in Therapy*, 35(3), 311-323. [CrossRef]
 13. Hatah, E., Braund, R., Tordoff, J., Duffull, S.B. (2014). A systematic review and meta-analysis of pharmacist-led fee-for-services medication review. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 77(1), 102-115. [CrossRef]
 14. Suzuki, M., Matsue, Y., Izumi, S., Kimura, A., Hashimoto, T., Otomo, K., Saito, H., Suzuki, M., Kato, Y., Funakoshi, R. (2018). Pharmacist-led intervention in the multidisciplinary team approach optimizes heart failure medication. *Heart and Vessels*, 33(6), 615-622. [CrossRef]
 15. Albekairy, A.M. (2014). Pharmacists' perceived barriers to patient counseling. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(1), 70-73.
 16. Kelly, W.N., Ho, M.J., Bullers, K., Klocksieben, F., Kumar, A. (2021). Association of pharmacist counseling with adherence, 30-day readmission, and mortality: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Journal of the American Pharmacists Association: JAPhA*, 61(3), 340-350. [CrossRef]
 17. World Health Organization (WHO) and International Pharmaceutical Federation (FIP) Web site (2011). Joint FIP/WHO guidelines on good pharmacy practice: Standards for quality of pharmacy services (Report No. 961). Retrieved From <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/medicines/norms-and-standards/guidelines/distribution/trs961-annex8-fipwhoguidelinesgoodpharmacypractice.pdf>. Accessed date: 16.06.2024.
 18. Okumura, L.M., Rotta, I., Correr, C.J. (2014). Assessment of pharmacist-led patient counseling in randomized controlled trials: A systematic review. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 36(5), 882-891. [CrossRef]

19. Salas, C.M., Miyares, M.A. (2015). Implementing a pharmacy resident run transition of care service for heart failure patients: Effect on readmission rates. *American Journal of Health-system Pharmacy: AJHP: Official Journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 72(11 Suppl 1), 43-47. [\[CrossRef\]](#)
20. Milfred-LaForest, S.K., Gee, J.A., Pugacz, A.M., Piña, I.L., Hoover, D.M., Wenzell, R.C., Felton, A., Guttenberg, E., Ortiz, J. (2017). Heart failure transitions of care: A pharmacist-led post-discharge pilot experience. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 60(2), 249-258. [\[CrossRef\]](#)
21. Warden, B.A., Freels, J.P., Furuno, J.P., Mackay, J. (2014). Pharmacy-managed program for providing education and discharge instructions for patients with heart failure. *American Journal of Health-System Pharmacy: AJHP: Official Journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 71(2), 134-139. [\[CrossRef\]](#)
22. Parajuli, D.R., Kourbelis, C., Franzon, J., Newman, P., Mckinnon, R.A., Shakib, S., Whitehead, D., Clark, R.A. (2019). Effectiveness of the pharmacist-involved multidisciplinary management of heart failure to improve hospitalizations and mortality rates in 4630 patients: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Cardiac Failure*, 25(9), 744-756. [\[CrossRef\]](#)
23. Moye, P.M., Chu, P.S., Pounds, T., Thurston, M.M. (2018). Impact of a pharmacy team-led intervention program on the readmission rate of elderly patients with heart failure. *American Journal of Health-System Pharmacy: AJHP: Official Journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 75(4), 183-190. [\[CrossRef\]](#)
24. Yassin, H.T., Hiwa, K., Saaed, K.A.O. (2020). Pharmacist collaborative care in heart failure management in Kirkuk City- Iraq. *Systematic Reviews Pharmacy*, 11(3), 309-319.
25. Schulz, M., Griese-Mammen, N., Anker, S.D., Koehler, F., Ihle, P., Ruckes, C., Schumacher, P.M., Trenk, D., Böhm, M., Laufs, U., PHARM-CHF Investigators (2019). Pharmacy-based interdisciplinary intervention for patients with chronic heart failure: Results of the PHARM-CHF randomized controlled trial. *European Journal of Heart Failure*, 21(8), 1012-1021. [\[CrossRef\]](#)
26. Roblek, T., Deticek, A., Leskovar, B., Suskovic, S., Horvat, M., Belic, A., Mrhar, A., Lainscak, M. (2016). Clinical-pharmacist intervention reduces clinically relevant drug-drug interactions in patients with heart failure: A randomized, double-blind, controlled trial. *International Journal of Cardiology*, 203, 647-652. [\[CrossRef\]](#)
27. Vinluan, C.M., Wittman, D., Morisky, D. (2015). Pharmacist discharge counselling in the elderly. *Journal of Pharmaceutical Health Services Research*, 6, 103-110. [\[CrossRef\]](#)
28. Barker, A., Barlis, P., Berlowitz, D., Page, K., Jackson, B., Lim, W.K. (2012). Pharmacist directed home medication reviews in patients with chronic heart failure: A randomised clinical trial. *International Journal of Cardiology*, 159(2), 139-143. [\[CrossRef\]](#)
29. R Lowrie, R., Mair, F.S., Greenlaw, N., Forsyth, P., Jhund, P.S., McConnachie, A., Rae, B., McMurray, J. J., Heart Failure Optimal Outcomes from Pharmacy Study (HOOPS) Investigators (2012). Pharmacist intervention in primary care to improve outcomes in patients with left ventricular systolic dysfunction. *European Heart Journal*, 33(3), 314-324. [\[CrossRef\]](#)
30. Korajkic, A., Poole, S.G., MacFarlane, L.M., Bergin, P.J., Dooley, M.J. (2011). Impact of a pharmacist intervention on ambulatory patients with heart failure: A randomised controlled study. *Journal of Pharmacy Practice and Research*, 41,126-131. [\[CrossRef\]](#)
31. Eggink, R.N., Lenderink, A.W., Widdershoven, J.W., van den Bemt, P.M. (2010). The effect of a clinical pharmacist discharge service on medication discrepancies in patients with heart failure. *Pharmacy World & Science: PWS*, 32(6), 759-766. [\[CrossRef\]](#)
32. McDonagh, T.A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R.S., Baumbach, A., Böhm, M., Burri, H., Butler, J., Čelutkienė, J., Chioncel, O., Cleland, J.G.F., Crespo-Leiro, M.G., Farmakis, D., Gilard, M., Heymans, S., Hoes, A.W., Jaarsma, T., Jankowska, E.A., Lainscak, M., Lam, C.S.P., Lyon, A.R., McMurray, J.J.V., Mebazaa, A., Mindham, R., Muneretto, C., Piepoli, M.F., Price, S., Rosano, G.M.C., Ruschitzka, F., Skibelund, A.K., ESC Scientific Document Group. (2023). Focused Update of the 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*, 44(37), 3627-3639. [\[CrossRef\]](#)



POLİDOPAMİN TEMELLİ NANOSİSTEMLERİN İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM OLARAK KULLANILMA VE TEDAVİ POTANSİYELLERİ

UTILIZATION OF POLYDOPAMINE-BASED NANOSYSTEMS AS DRUG DELIVERY SYSTEMS AND THEIR THERAPEUTIC POTENTIALS

Eda TURAN AYHAN^{1,2} , Sibel İLBASMIŞ TAMER^{1*} 

¹Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06330, Ankara, Türkiye

²Adıyaman Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 02040, Adıyaman, Türkiye

ÖZ

Amaç: Polidopamin (PDA), dopamin monomerinin oto-oksidasyon ve polimerizasyon sürecinin son ürünüdür. PDA, özellikle fototermal dönüşüm yeteneği, ilaç bağlama kapasitesi, çok yönlü adezyon ve biyoadezyon yeteneği, pH değişimine duyarlı olma özelliği ve yüksek biyouyumluluk ile biyomedikal alanlarda büyük potansiyel göstermiştir. Ayrıca taşıdığı üstün özellikler, PDA temelli nanopartikülleri ilaç taşıyıcı sistemler ve tedaviler için potansiyel hale getirmiştir. Bu derlemede, PDA'nun, polimerizasyon mekanizmalarının ve PDA temelli nano-sistemlerin çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisindeki potansiyellerinin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi, özellikle PDA'nın tıp ve eczacılık alanındaki rolünün belirgin hale getirilmesi amaçlanmaktadır.

Sonuç ve Tartışma: Yapılan literatür araştırmalarında; üstün özellikleriyle PDA temelli nanosistemlerin, birçok alanda tanı ve tedavi için umut vadeci sistemler olduğu görülmüştür. PDA nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, stabilitesi, ilaç salım optimizasyonu, biyodağılım ve uzun vadeli toksisite analizi gibi konularda çalışmalar her geçen gün artmaktadır. PDA'nın metabolizma ve biyodegradasyon mekanizmalarının anlaşılması gibi tam olarak netleştirilememiş bilgilerin aydınlatılmasıyla bu sistemlerin tanı ve tedavide etkin olarak yer alabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: İlaç taşıyıcı sistem, nanopartiküller sistemler, polidopamin, tedavi

ABSTRACT

Objective: Polydopamine (PDA) is the end product of the auto-oxidation and polymerization process of dopamine monomers. PDA has demonstrated significant potential in biomedical fields, particularly due to its photothermal conversion ability, drug binding capacity, versatile adhesion and bioadhesion capabilities, sensitivity to pH changes, and high biocompatibility. Moreover, its superior features have made PDA-based nanoparticles promising for drug delivery systems and treatments. In this review, a comprehensive evaluation of the potential roles of PDA, polymerization mechanisms, and PDA-based nanosystems in the diagnosis and treatment of various diseases is aimed, with a specific emphasis on highlighting the role of PDA in the medical and pharmaceutical fields.

Results and Discussion: In literature research, PDA-based nanosystems have been recognized as promising systems for diagnosis and treatment in various fields due to their superior properties. Studies on topics such as particle size, stability, drug release optimization, biodistribution and long-term toxicity analysis of PDA nanoparticles are increasing day by day. It is believed that with the

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Sibel İlbasmış Tamer
e-posta / e-mail: ilbasmis@gazi.edu.tr, Tel. / Phone: +903122023056

clarification of unresolved and understanding of PDA metabolism and biodegradation mechanisms, these systems can effectively contribute to diagnosis and treatment.

Keywords: *Drug delivery system, nanoparticulate systems, polydopamine, treatment*

GİRİŞ

Nanopartiküller (NP'ler), 1-100 nanometre boyut aralığındaki parçacıklardır [1]. Nanoteknolojinin hızla ilerlemesi, ilaçların belirli hücelere hedeflendirilmesi için umut veren nanopartiküllerin gelişmesine yol açmıştır. Bu gelişmeler, ilaçların yan etkilerini azaltmayı ve çoklu ilaç direncini aşmayı hedeflemektedir. Birçok araştırmacı, daha etkili nanopartiküllerin üretimine odaklanmış olmasına rağmen, tüm istenen özellikleri tek bir sistemde birleştirmek zor olmuştur. Nanopartiküllerin uygun şekilde modifiye edilerek; nanopartiküllere ideal biyolojik uyumluluk, çeşitli işlevsellik, kolloidal kararlılık ve fototermal dönüşüm yeteneği gibi özelliklerin kazandırılması gerekli görülmüştür [2].

Polidopamin (PDA) adlı çok yönlü bir polimer, ilaç taşıyıcı olarak kullanılan nanopartiküllerin yüzey işlevlendirmesine yeni bir perspektif kazandırmıştır. Lee ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada; midyelerin suyun varlığında farklı yüzeylere güçlü bir şekilde yapışabilen protein ürettikleri tespit edilmiştir. Bu bileşen, nörotransmitter dopaminin (DA) bir türevidir ve midyelerin yapışkanlığının temelini oluşturur. Bilim insanları, midyelerin yapışkan özelliklerini temelde dopamin ile ilişkilendirmiş ve bu mekanizmanın üzerinde durmuşlardır [3,4]. Dopamin polimerizasyonu sırasında hem kovalent oksidatif polimerizasyonun hem de spontan düzenleme yollarının etkili olduğu düşünülmektedir [5,6]. PDA çok fonksiyonlu özellikleri nedeniyle literatürde özellikle kanser tanı ve tedavisinde, antibakteriyel tedavi alanlarında yaygın olarak çalışılmıştır. Ayrıca PDA ile, medikal implantların ve cihazların biyoyuumluluğunu artırmaya yönelik doku onarım mekanizmaları ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. [4].

Bu derlemede, PDA'nın polimerleşme mekanizmaları ile ilgili bilgi verilerek PDA temelli nano sistemlerin özellikle ilaç taşıyıcı sistem olarak eczacılık ve tıp alanındaki uygulamaları ele alınacaktır. Bu sistemlerin genel özellikleri, avantajları ve dezavantajları kapsamlı bir şekilde değerlendirilecek, PDA ile ilgili yapılan çalışmalar ile alınan patentlerden bahsedilecektir.

PDA'nın Hazırlanması

Dopamin Polimerizasyonu

PDA, bir biyopolimerdir ve dopamin moleküllerinin polimerizasyonu ile oluşturulur. Dopamin polimerizasyonunun mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır. Dopamin polimerizasyon mekanizması hakkında en yaygın kabul gören teori, Lee ve ark. tarafından önerilmiştir. Bu teori, dopaminin polimerizasyonu sırasında hem kovalent oksidatif polimerizasyonun hem de spontan düzenleme yollarının varlığını öne sürmektedir [3,5,6].

Dopamin Polimerizasyonunu Koşulları ve Polimerizasyon Mekanizması

DA, basit koşullar altında kendiliğinden polimerleşebilir ve çeşitli yüzeylere hızla yapışan PDA kaplamalar oluşturabilir, ancak dopaminin çözelti içindeki polimerleşme mekanizması hala belirsizdir ve bazı araştırmacılar karmaşık redoks süreci nedeniyle farklı görüşlere sahiptir, polimerizasyon ve reaksiyon sürecinde bir dizi ara madde oluşur [7].

Alkali koşullarda, dopaminin katekol grubu, oksitlenerek dopamin-benzokinin adı verilen bir bileşik oluşturur. Dopamin-benzokininler daha sonra içmoleküler siklizasyona uğrayarak renksiz dopamin türevlerini oluşturur ve bu renksiz türevler daha fazla oksitlenerek pembe ara ürün dopamin türevlerini üretir. Ancak, pembe dopamin türevleri kararlı değildir ve kısa süre içinde daha fazla oksidatif yeniden düzenlemeye uğrayarak 5,6-dihidroksiindol adı verilen bir bileşik oluşturur. Bu hem moleküller içinde hem de moleküller arasında yeniden düzenlemelere yol açar ve sonuç olarak koyu kahverengi-siyah renkli oksidatif polimer olan PDA oluşur [8]. DA polimerizasyonu, melanin sentezine benzer çeşitli oksidatif ürünleri içerir. Alkali ve oksijenli koşullarda, DA monomeri DA-kinon'a oksitlenir, ardından lökodopamin krom oluşturmak için moleküller arası halkalanma gerçekleşir. Bu ürün, daha fazla oksidasyon ve yeniden düzenlemeyle 5,6-dihidroksiindol oluşturur. 5,6-

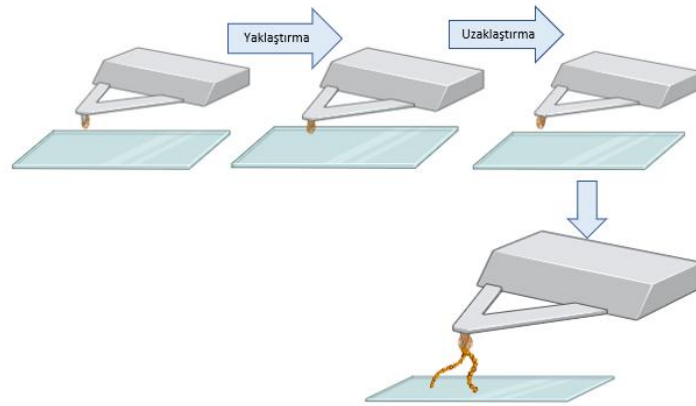
dihidroksiindol, iki yolla ürün oluşturur: kovalent oksidatif polimerizasyon ve non-kovalent kendi kendine birleşme. Kovalent yol, DA'nın kendi kendine polimerizasyonunu içerirken, bazı DA molekülleri polimerize olmadan kalır ve 5,6-dihidroksiindol ile fiziksel trimerler oluşturur. Bu kendi kendine birleşme, iyonik ve hidrojen bağları gibi non-kovalent etkileşimlerle gerçekleşir [9]. Bu noktada, PDA'nın oluşumu hakkında iki ana görüş vardır:

1) PDA oluşumu, melanin biyosentezinin başlangıç aşamalarıyla benzerlik gösterir. Bu süreç, DA moleküllerinin kimyasal değişimlerinden oluşur: Dopamin, bir oksidasyon reaksiyonu ile dopamin-kinona dönüşür. Dopamin-kinon, molekül içinde bir siklizasyon reaksiyonu geçirir ve dopamin-krom oluşturur. Dopamin-krom, daha fazla oksidasyon geçirerek 5,6-dihidroksiindol (DHI) oluşur. DHI, daha fazla oksidasyonla 5,6-indolkinona dönüşür. Yapılan çalışmalar, PDA'nın kovalent bir polimer olduğunu, ancak yapı taşlarının farklı doygunluk derecelerine sahip çeşitli indol ünitelerinin karışımlarından ve açık zincir dopamin ünitelerinden oluştuğunu göstermiştir [10].

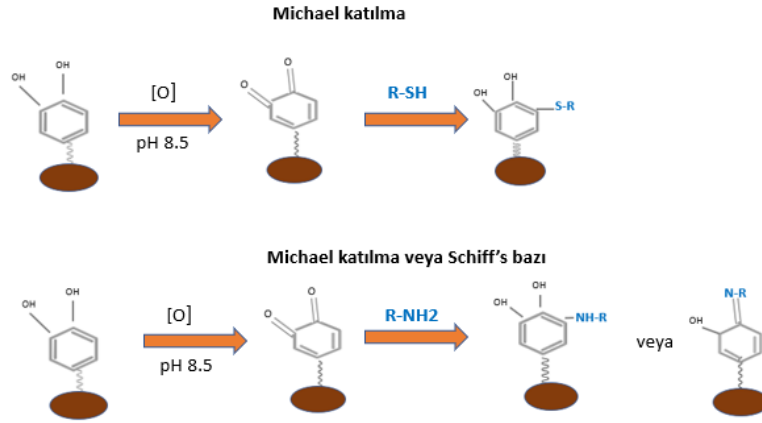
2) Supramoleküler Agregat Modeli: Bu modelde, PDA'nın kovalent bir polimer değil, supramoleküler bir agregat olduğu öne sürülmüştür. Bu görüşe göre PDA, DHI ve onun dione türevlerinin monomerleri arasında çeşitli non-kovalent etkileşimlerle bağlanmış bir yapıdadır [11,12].

(Dopamin)/5,6-dihidroksiindol adı verilen trimerlerin PDA oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir. Çünkü bu trimerler oksidatif polimerizasyon ürünleri ile kimyasal bağlar aracılığıyla yakından etkileşime girerler. Messersmith ve ark. yaptıkları çalışmada PDA'nın kovalent bağlarla birbirine bağlı yüksek molekül ağırlıklı polimer zincirler içerdiğini göstermişlerdir. Çalışmada, PDA'yı araştırmak için Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) destekli tek moleküllü kuvvet spektroskopisi (SMFS) kullanılmıştır. Mikroskobun iğne ucu PDA ile kaplanmış, bu uç mikroskobun ölçüm yüzeyine yaklaştırılıp uzaklaştırılarak PDA'nın yapısı aydınlatılmıştır. PDA'lı uç yüzeye yaklaşırken yüzeyle etkileşim kurmuş ve uzaklaşması sırasındaki gerilme direnci mikroskopta polimerik zincirlere özgü bir cevap oluşturmuştur (Şekil 1). Bu da PDA'nın gerçek bir polimer olduğunu kanıtlamıştır. Messersmith ve ark. başka bir çalışmalarında DHI moleküllerinin dallanma reaksiyonları geçirdiğini ve bu moleküllerin bir araya gelerek kovalent bağlarla bağlı bir polimer oluşturduğunu öne sürdüler. Bu modelde, DHI molekülleri, 2, 3, 4 ve 7 numaralı pozisyonlarda dallanarak daha büyük oligomerler ve sonunda kovalent bağlarla bağlanmış bir polimer yapısını oluşturduğunu göstermişlerdir [3,13].

Polidopamin, büyük miktarlarda katekol, kinin ve amin grupları içermesi nedeniyle orta derecede hidrofildir. Aminler ve tiyoller gibi işlevselliğe sahip reaktifler, aza veya tio-Michael ilavesi ve Schiff bazı reaksiyonları aracılığıyla PDA yüzeyinde açığa çıkan diketon veya katekol gruplarını hedef alabilirler (Şekil 2) [14].



Şekil 1. Atomik kuvvet mikroskobisi (AFM) kullanılarak yüksek moleküler ağırlıklı polimer olan PDA'nın tayini [BioRender ile düzenlenmiştir]

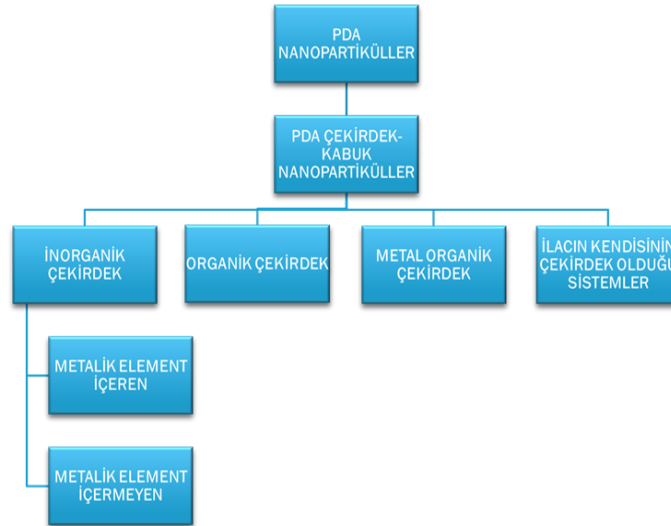


Şekil 2. Aminlenmiş ve tiyollenmiş ligandların polidopamin ile Schiff bazı ve Michael katılma reaksiyonları [BioRender ile düzenlenmiştir]

PDA sentezinde; çözelti oksidasyonu, enzimatik oksidasyon ve elektropolimerizasyon olmak üzere üç yaklaşım vardır, bunlar arasında çözelti oksidasyonu en yaygın olarak kullanılanıdır. Enzimatik oksidasyon yönteminde polimer sentezini katalize etmek için enzimlerin, elektropolimerizasyon yönteminde ise belirli elektrotların kullanılması gerekir. Çözelti oksidasyon yöntemi ise; dopamin hidroklorürünün alkali bir çözeltide, atmosferik oksijenin varlığında kendi kendine polimerizasyonunun başladığı bir yöntemdir. Bu kendi kendine polimerizasyon, reaksiyonun kolayca ve herhangi bir karmaşık prosedüre ihtiyaç duymadan gerçekleşmesini sağlar [15].

PDA Nanopartikül Türleri

PDA tek başına nanopartiküler sistem oluşturabileceği gibi farklı sistemlerle birlikte çekirdek-kabuk nanopartikülleri oluşturabilir. Şema 1'de PDA nanopartiküller özetlenmiştir.



Şema 1. PDA nanopartikül türleri

PDA Çekirdek-Kabuk Nanopartiküller

PDA çekirdek-kabuk nanopartiküllerinin sentezi; dopamin hidroklorürün, pH 8.5 Tris-HCl tamponunda karıştırılması yoluyla gerçekleştirilir. Adezyon yeteneği ve çoklu biyokimyasal özellikleri

nedeniyle, PDA hem organik hem de inorganik nanopartiküllerin kaplaması için yaygın olarak kullanılan bir maddedir [16,17].

İnorganik Çekirdek

PDA ile kaplanmış inorganik nanopartiküller incelendiğinde; altın nanopartiküller gibi metal çekirdekler, manyetik nanopartiküller ve mesopöz silika nanopartiküller (MSN) gibi metal olmayan çekirdekler, PDA ile basit bir şekilde kaplanabilir.

Metalik Element İçerenler; Bu grup içerisinde altın nanopartiküller ve demir oksit nanopartiküller ile çalışılmıştır. İlaç taşıyıcı sistem olarak PDA kaplı manyetik nanopartiküllerin geliştirilmesi; aynı anda manyetik rezonans görüntüleme, fototermal tedavi ve kemoterapi gibi kombine tedavilerin geliştirilmesine imkân verir [18].

Xue ve ark. çekirdek-kabuk yapıları ve PDA kaplamalı çok işlevli pegile manyetik NP'ler tasarlamışlardır. Bu NP'ler, antikanser etkili doksorubisin (DOX) ile yüklenmiş ve hedeflendirilmiş kemoterapi ile tümör hücrelerinin yok edilmesi için kullanılmıştır. Özellikle, kemoterapi ve fototermal tedavinin birleşimi tümör hücrelerinin yok edilmesinde belirgin bir sinerjistik etkiye sahip bulunmuştur [19]. Altın NP'ler yakın kızılötesi bölgede güçlü bir şekilde absorbe edilirler, bu da onları teşhis, görüntüleme, ilaç taşıma ve fototerapi için kontrast ajan olarak kullanışlı hale getirir. Altın PDA NP'ler ise biyosensör teknolojisi, teranostik alan ve ilaç taşıyıcı sistem olarak farklı kullanım alanlarına sahiptir. Yapılan bir çalışmada araştırmacılar Tris tamponunda (pH 8.5) altın nanorodların üzerinde dopamin polimerizasyonuna izin vererek PDA ile kaplı altın nanorodları hazırlamışlar ve daha sonra PDA ile kaplı nanorodları kanser hedefli görüntüleme ve fototermal tedavi için anti-EGFR antikoları ile işlevselleştirmişlerdir [20]. Başka bir çalışmada ise araştırmacılar, *Mycobacterium tuberculosis*'e (MTB) özgü DNA'yı tespit etmek için altın PDA NP'leri kullanarak son derece duyarlı ve etkili biyoelektrot geliştirmişlerdir. Sistem MTB'ye özgü DNA'yı tespit etmede çok stabil, duyarlı ve etkili bulunmuştur. Ayrıca bu tarz sistemlerin COVID-19, Alzheimer, kanser ve diğer klinik hastalıklar için elektrokimyasal biyosensör geliştirilmesinde de rol model olabileceği düşünülmüştür [21]. Metalik element içeren PDA NP'lerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımına başka bir örnek verilecek olursa, meme kanserinin kimyasal ve fototermal tedavisini hedefleyen yeni bir nanotaşıyıcı sistem tasarlanmıştır. Altın NP'lerin PDA ile kaplandığı, pegile metotreksat içeren sistem, meme kanseri tedavisinde etkili olmakla birlikte düşük toksisiteye sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca geliştirilen sistemin biyoyumlu ve kararlı olduğu, etkili ilaç salımı yaptığı, yakın kızılötesi (NIR) lazer ışınları ve/veya pH değişiklikleri ile uyarılabilir olduğu tespit edilmiştir [22,23].

Metalik Element İçermeyen; Metal içermeyen çekirdek yapı olarak, mesoporöz silika nanopartikülleri (MSNs), özel gözenekli bir yapıda, biyoyumlu, kimyasal olarak stabilize ve yüksek ilaç salımı yapabildikleri için umut verici ilaç taşıyıcılarıdır. MSNs-PDA kombinasyonu ile özellikle kanser tedavisi başta olmak üzere farklı etkin maddeler ile etkili ilaç taşıyıcı nanosistemler geliştirilmiştir [24].

Organik Çekirdek

PLGA (Poli (d, l-laktik-ko-glikolik asid) organik çekirdek olarak mükemmel biyoyumluluğa ve biyoparçalanabilirliğe sahiptir, ancak yüksek derecede hidrofobik yapısı, hidrofilik ilaçları enkapsüle edebilme yeteneğini sınırlar. PLGA çekirdek-PDA kabuk yapıları sentezlendiğinde ilaç yükleme etkinliği ve hücre biyoadezyonu yüksek olan ilaç taşıyıcı sistem sayesinde ilaç etkinliği artırılmış olacaktır [25].

Metal Organik Çekirdek

Metal-organik nanopartiküllerin (MOF NP'ler) sitotoksitesite ve düşük çözünürlük gibi dezavantajlarının PDA ile giderilebileceği düşünülmüştür. Ayrıca bu sistemlerde oluşturulan PDA katmanı sayesinde daha iyi modifiye edilerek, kontrollü, hedefli ilaç salım özelliği kazanacaklardır [26].

İlacın Kendisinin Çekirdek Olduğu Sistemler

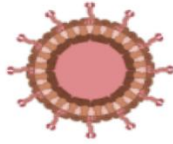
Bazı ilaçlar kendiliğinden bir araya gelerek (örneğin DOX nanopartikülleri, paklitaksel (PTX) nanopartikülleri) nanopartiküller oluştururlar. Bu nanopartiküller PDA ile kaplandığında, ilacın kan dolaşım süresini uzayıp ilacın hedeflenen bölgeye daha etkili bir şekilde ulaşması sağlanacaktır [11].

PDA ile Modifiye Edilmiş Nanopartiküllerde İlaç Yükleme Stratejileri

PDA ile modifiye edilmiş ilaç taşıyıcı sistemler, antikolar, sitokinler ve diğer biyoaktif peptitler veya proteinler gibi çeşitli bileşenleri içerebilirler. Bu şekilde elde edilen ilaç taşıyıcı sistemleri hedefleme, görüntüleme, kimyasal tedavi, fotodinamik tedavi, fototermal tedavi ve doku onarımı gibi pek çok farklı amaç için kullanılabilirler [27]. İlaçları, PDA-modifiye nanopartiküller üzerine yerleştirmek için; yüzeyde bağlama, matris izleme, kapsülleme, kimyasal bağlama ve kendiliğinden oluşma olmak üzere beş temel strateji (Şema 2) bulunmaktadır [11,28,29].

PDA ile Modifiye Edilmiş Nanopartiküller İlaç Taşıyıcıların Uygulama Alanları

Nanopartiküller, PDA ile modifiye edilerek çeşitli ilaç yüklemeleri sonrasında, hedefleme, görüntüleme, kimyasal tedavi, fotodinamik terapi, fototermal terapi, kemik yenilenmesi ve antiinflamatuvar etki gibi çoklu işlevlere sahip yeni ilaç sistemlerine dönüştürülebilir. PDA ile modifiye edilmiş çok fonksiyonlu nanopartiküller ilaç sistemleri pek çok alanda kullanılsa da; kanser tedavisi, antibakteriyel tedavi, oksidatif stres ve inflamasyonun önlenmesi, doku onarımı alanlarında daha yaygın kullanılmaktadır [11]. Şema 3'de yaygın olarak kullanıldıkları uygulama alanları gösterilmektedir.



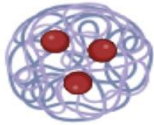
1. Yüzeyde Bağlama: İlk strateji, ilaçları PDA ile modifiye edilmiş nanopartiküllerin yüzeyine, fiziksel adsorpsiyon (van der Waals kuvveti veya hidrojen bağı gibi) veya kimyasal bağ (örneğin Michael eklemesi veya Schiff baz reaksiyonu) ile bağlamayı içerir. Bu yöntem, PDA ile modifiye edilmiş çekirdek-kabuk nanopartiküllerde ilaç yükleme için yaygın olarak kullanılır.



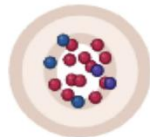
2. Matris İzleme: İkinci strateji, fiziksel adsorpsiyon veya kimyasal bağ kullanarak ilaçları nanopartikül matrisine yerleştirmeyi içerir. Bu yaklaşım, çok katmanlı PDA-modifiye nanopartiküllerde kullanılabilir.



3. Kapsülleme: Üçüncü yaklaşım, ilaçları boş nanopartikül içine yerleştirmeyi veya bunları malzemelerin (örneğin mesoporöz silika nanopartiküller veya metal-organik çerçeveler) gözeneklerine yerleştirmeyi içerir. Daha sonra PDA tabakası oluşturulur. Bu durumda PDA, ilacın erken salımını önlemek amacıyla bir "geçit bekçisi" işlevi görür.

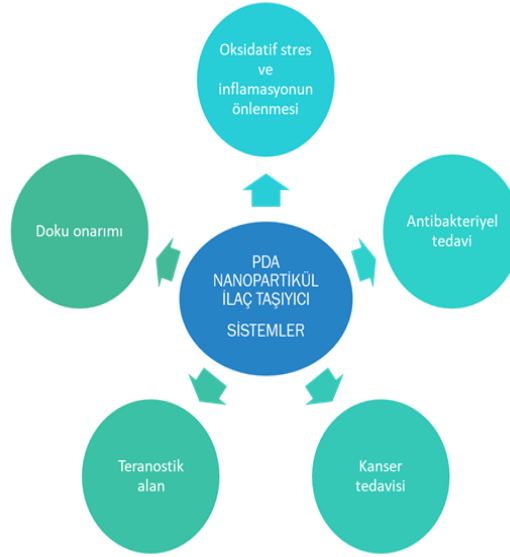


4. Kimyasal Bağlama: Dördüncü strateji, ilaç-PDA konjugatlarının kimyasal bağ ile oluşturulmasını içerir. Bu, ilaç ile PDA-modifiye nanopartikül arasında kalıcı bir bağ oluşturur.



5. Kendiliğinden Oluşma: Bazı ilaçlar, örneğin doksorubisin ve paklitaksel kendiliğinden bir araya gelebilme yeteneğine sahiptir. Bu kendiliğinden bir araya gelen ilaç nanopartikülleri, dolaşım süresini uzatmak ve ilacın erken salımını önlemek amacıyla PDA ile kaplanabilir.

Şema 2. PDA ile modifiye edilmiş nanopartiküllerde ilaç yükleme stratejileri [BioRender ile düzenlenmiştir]



Şema 3. PDA ile modifiye edilmiş nanopartiküler ilaç taşıyıcıların yaygın kullanım alanları

Kanser Tedavisinde PDA Nanopartiküller

PDA içeren nanopartiküller, geleneksel kemoterapinin neden olduğu çoklu ilaç direncini önlemeye yardımcı olan fototermal tedavi olanaklarını sağlamaktadır. Özellikle hidrofobik ilaçlar başta olmak üzere kemoterapötik ajanların yükleme verimliliğini önemli ölçüde artırmaktadır [10]. Farklı işlevsel moleküller, hedefleme ligandları gibi ajanlar çok işlevli tümör tedavisi sağlamak amacıyla yapıya bağlanabilir. Tümör bölgesine yönelik seçicilik sorununu çözmek amacıyla, hedefleme bağlayıcılarının kullanılmasıyla doku hedefli kemoterapi, PDA üzerine Michael ekleme veya Schiff bazı reaksiyonları ile bağlanabilen hedefleme bağlayıcıları aracılığıyla gerçekleştirilebilir. PDA'nın özgün ilaç yükleme modeliyle, ilaçlar ile PDA arasındaki bağ, tümörün asidik ve yüksek glutatyon (GSH) içeren mikroçevresinde zayıflamaya eğilimlidir, bu da ilaca pH ve GSH'ye yanıt veren, doku hedefli kontrollü ilaç salım profili sağlamaktadır [30,31]. PDA'nın antikanser etkili doksorubisin (DOX) etkin maddesinin salımını kontrol altına almak için kullanıldığı bir çalışmada, PDA ile kaplanmış pegile DOX yüklü gözenekli silika nanopartiküllerinin (MSN) (MSNs-DOX@PDA-PEG) meme kanseri tedavisinde etkinliği incelenmiştir. *In vitro* ve *in vivo* meme kanseri deneyleri sonucunda, geliştirilen bu sistem meme kanseri için umut verici olarak bulunmuştur. Bu sistemde; PDA, DOX'un MSN'lerden pH uyarısına yanıt olarak salımını kontrol etmek için pH duyarlı bir kilit görevi görmüş ve PEG, fizyolojik koşullar altında stabilite ve biyoyoumluluğu artırmak için PDA'nın yüzeyine bağlanmıştır [24]. Li ve ark. ise meme kanseri tedavisi için hedeflendirilmiş fototermal ve kemoterapi yöntemlerini içeren Au@PDA-PEG-Metotreksat (MTX) nanopartiküller geliştirmişlerdir. Bu nanopartiküller tümör hücrelerine alındığında MTX, özellikle asidik mikroçevrede (pH 5.5) amit bağının çözülmesiyle serbest bırakılmaktadır. Ayrıca NIR lazer ışınları, AuNP'lerin ısı üretmesine sebep olarak, PDA yüzeyinde adsorbe edilen MTX'nin ikinci aşamada salım yapmasını sağlamaktadır. Sentezlenen nano ilaç taşıyıcı, kimyasal, fototermal ve fotodinamik tedavileri içeren çoklu tedavileri içermektedir. Sentezlenen NP'ler; uzun dolaşım süresi, hedefe yönelik ilaç salımı ve biyogörüntüleme özelliklerine sahiptir. Çalışma, kanseri tedavi etmek için çoklu tedavilerin birleştirilmesi yaklaşımıyla, onkoloji alanında gelişmeleri hızlandırabilecek umut verici bir stratejidir [22]. Hedefleme yaklaşımına diğer bir örnek prostat kanseri tedavisinde kullanımına yöneliktir. Yapılan bir çalışmada altın nanopartiküllerin yüzeyinde negatif bir yük tabakası olan PDA kaplama, hücre sitotoksitesini azaltmakla kalmamış, aynı zamanda prostat kanseri hücrelerinde küçük müdahaleci RNA'nın (siRNA) hücreler tarafından %90'dan fazla alınmasını sağlamış ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ekspresyonunda %51 azalma sağlamıştır. siRNA, gen susturma için etkili bir yaklaşım olup birçok hastalığı hedef genleri baskılaya yeteneğine sahiptir. EGFR ise, reseptör tirozin kinazlar (RTK) ailesine aittir ve farklı karsinom türlerinin patogeneğinde ve ilerlemesinde rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Çalışmada, geleneksel

ilaçlarla tedavi sonuçlarının zayıf olmasının nedenlerinden biri olan kanser hücrelerinin apoptoza direnç göstermesi durumu, geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemle %54 apoptoz oranıyla başarılı bulunmuştur [32]. Bir başka çalışmada, manyetik rezonans görüntüleme ve antitümör kemo-fototermler için epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) antikoruna yönelik polidopamin kaplı manyetik demiroksit (Fe_3O_4) nanopartikülleri ($Fe_3O_4@PDA$ NP'ler) geliştirilmiştir. Sentezlenen manyetik nanopartiküller Tris tamponunda (pH 8.5) süspansiyon edilmiş ve üzerine 0.03 M dopamin çözeltisi eklenmiştir. Oda sıcaklığında 3 saat karıştırılan çözelti zamanla koyu kahverengiye dönmüştür. PDA kaplı manyetik nanopartiküller yıkama işleminin ardından Tris tamponu içinde $NH_2-PEG-COOH$ ile bir gece boyunca etkileştirilmiştir. Tekrardan deiyonize su ile yıkanıp doksurubisin ile etkileştirilmiştir. Çalışma, $Fe_3O_4@PDA$ NP'ler ile tedavi etkinliği artırılmıştır [33]. PDA NP'lerin kanser tedavisinde fototermler ve fotodinamik potansiyeli üzerine yapılan çalışma ile 200-500 nm boyutlu PDA NP'ler ile PDA- Klorin e6 (Ce6) NP'lerin fototermler tedavi (FTT) etkinliği araştırılmıştır. Sonuçlar, hem 200 nm hem de 500 nm boyutlu PDA NP'lerin ve PDA-Ce6 NP'lerin FTT için uygun ajanlar olduğunu göstermektedir. Ayrıca, PDA-Ce6 NP'lerin fotodinamik tedavi (FDT) potansiyeli incelenmiş ve FDT için yeterli düzeyde reaktif oksijen radikali (ROS) ürettiği görülmüştür. İn vitro hücre kültürü deneyleri ile etkinlikleri kanıtlanmıştır [34].

Antibakteriyel Kullanım için PDA Nanopartiküller

Antibakteriyel tedavi, hücrelere ve dokulara zarar vermeden mikroorganizmaların ve biyofilmlerin yok edilmesini ve bakterilerin ilaç direncini azaltmayı gerektirir. PDA NP'ler; kimyasal ve fiziksel antibakteriyel etkileri artırmak için yenilikçi bir bakterisit olarak antibakteriyel uygulamalarda başarılı olmaktadır. PDA, bakteri hücrelerinin yüzeyi ile fiziksel etkileşim kurarak, salgılanan proteinlerle etkileşip bakterilerin yaşamını bozarak metabolizmalarını engelleyecektir. Ayrıca PDA, yakın kızılötesi (NIR) ışığın etkisi altında, fototermler antibakteriyel yeteneği sayesinde biyofilm matrisini yok edebilir [3,11]. PDA'nın antioksidan ve pro-oksidan özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Bu madde, tekrar tekrar elektron kabul edip verme yeteneğine sahiptir ve serbest radikal temizleme özellikleri sergileyebilmektedir. Ayrıca reaktif oksijen türleri (ROS) üretme yeteneğine de sahiptir, bu da onun antimikrobiyal özelliklerini açıklamaktadır. PDA'nın kimyası, kinon ve hidrokinon yapıları arasında iki elektron transferini içerir. PDA'nın katekolik grupları, oksijen molekülüne elektron vererek hidrojen peroksit üretir, bu da daha sonra hidroksil radikalini oluşturur ve yerinde ve anında antibakteriyel aktiviteye yol açar [14]. PDA'nın biyoyumluğa zarar vermeden, antimikrobiyal direncin gelişimine karşı potansiyelini değerlendiren bir çalışmada; dopaminin, alkali koşullarda kendiliğinden polimerizasyonu sonucu yüzey işlevselliğine sahip PDA NP'ler üretilmiştir. Bu NP'ler, aminoglikozitleri (AG) bağlamak için kullanılan yüzey işlevselliğine sahiptir ve PDA-AG nanokonjugatları elde etmek için kullanılmıştır. Bu nanokonjugatlar, klinik izolatlar kadar dirençli suşlara karşı sitotoksikite göstermeden mükemmel biyolojik aktivite sergilemişlerdir [35]. PDA'nın ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı başka çalışmada metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un (MRSA'nın) hedefli olarak yakalanması amaçlanmıştır. Dopamin yüzey olarak kullanılmış ve polimerleştirilerek PDA elde edilmiştir, yapıya gümüş nitrat ($AgNO_3$) bağlanarak antimikrobiyal özellikli gümüş-polidopamin nanopartikülleri ($Ag@PDA$ NPs) elde edilmiştir. Ardından MRSA bakterisi için üretilmiş bir ucu tiol (-SH) grubu taşıyan aptamerler ile yapı fonksiyonlandırılmıştır. Bu yapının içine indosiyanın yeşili (indocyanine green, ICG) boyası gönderilerek 808 nm yakın infrared (NIR) lazer ışığı altında MRSA; fototermler, fotodinamik tedavi ve gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal etkisi ile seçici ve hassas olarak yüksek oranda yok edilmiştir [36]. MRSA bakterilerine karşı hedeflenmiş polidopamin nanopartikülleri geliştirilmesini içeren başka bir çalışmada pegile PDA nanopartiküllerinin vankomisin (Van) molekülleri ile modifiye edilmesi sayesinde MRSA hücre duvarına karşı çoklu hidrojen bağları oluşturularak etkili bir hedefleme sağlanmıştır. PDA-PEG-Van nanopartiküllerinin MRSA'yı hedefleme yeteneği, düşük güçte NIR lazer ışığı altında bakterilerin lokalize ısıya maruz kalmasını sağlayarak öldürülmesini mümkün kılmıştır. Biyotoleransı yüksek, etkili antibakteriyel aktiviteye sahip olan bu nanopartiküller, MRSA ile ilişkili enfeksiyonlara karşı umut verici bir tedavi seçeneği sunmaktadır [37]. PDA'nın antibakteriyel etkinliğini gösteren başka bir çalışmada, kimyasal olarak çapraz bağlı bir dekstran hidrojeline PDA eklenmiştir. Geliştirilen hibrit hidrojel yapıları, su içeriği, termal kararlılık, mekanik performans ve ilaç yüklemesi/salınması performansı,

pre-jel çözeltisindeki PDA içeriğini değiştirerek hassas bir şekilde ayarlanabilmiştir. *In vitro* sitotoksitesite testi, dekstran/PDA hidrojelinin uygun biyouyumluluğa sahip olduğunu kanıtlamıştır. İlaç yükleme deneyi, hidrojelin ilave edilen antibiyotikler için uzun süreli sürdürülebilir salım yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Geliştirilen formülasyonun *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı yüksek etkili özelliklere sahip olduğu kanıtlanmıştır. *In vivo* hayvan deneyleri sistemin, yara iyileşmesini hızlandırdığını doğrulamıştır [38]. PDA NP'lerin kaplama materyali olarak da antibakteriyel etkinlikleri mevcuttur. Farklı yüzeylerin (cam, polikarbonat, implantlar vb.) topografik deseninin değiştirilmesi, mikroorganizmaların tutunmasını azaltmaya yardımcı olur ve böylece biyofilm oluşumunu engeller. Bu yaklaşım, tıbbi implantlar ve biyomedikal cihazlar üzerine kaplama için uygundur ve mikroorganizmaların yüzeye bağlanmasına izin veren yüzey geometrisinin zayıflamasını sağlar. Lim ve ark. çalışmalarında, kateter ilişkili enfeksiyonları önlemek için sentetik bir antimikrobiyal peptidin bağlanması için basit ancak etkili bir immobilizasyon stratejisi sunmuşlardır. PDA, bir polidimetilsiloksan (PDMS) yüzeyine ince bir yapışkan film olarak kaplanmış ve polimerin yüzeyine antimikrobiyal peptidin bağlanması kolaylaşmıştır. Geliştirilen sistemin antimikrobiyal ve antibiyofil özellikleri yüksek bulunmuştur [39].

Oksidatif Stres ve İnflamasyonun Önlenmesinde PDA Nanopartiküller

PDA NP'ler, bol miktarda fenol ve katekol gibi indirgeyici gruplar içerir. Bu guruplar, serbest radikal temizlemede etkili olurlar. Bu sayede, PDA'nın antioksidan özelliklere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu antioksidan etkiler, reaktif oksijen türlerinin (ROS) vücutta neden olduğu oksidatif stresi azaltmada yardımcı olabilmektedir [40]. Özellikle periodontal hastalıklar gibi inflamatuvar durumlarda, PDA'nın antioksidan özellikleri, ROS'un neden olduğu inflamasyonu baskılamada etkili olabilmektedir. Aynı şekilde, diğer inflamatuvar hastalıkların tedavisi için de PDA nanopartikülleri etkili olacaktır. [41]. Bu nedenle, PDA'nın hem antimikrobiyal hem de antioksidan özelliklere sahip olması, çeşitli klinik uygulamalarda potansiyel olarak faydalı olabileceğini göstermektedir. Bu özellikleri, biyomedikal alanda çeşitli uygulamalara yol açabilir ve hastalıkların tedavisi ve önlenmesi konusunda yeni yaklaşımlar sunabilir [14]. Örneğin bir çalışmada, oksidatif stres kaynaklı diş eti hastalığında temizleyici olarak biyobozunur PDA NP'ler kullanılarak yüksek etki görülmüştür. Spektroskopik ve *in vitro* deneyler, PDA NP'lerin çoklu ROS'ları süpürmedeki rolü ve ROS tarafından indüklenen inflamasyon tepkisini bastırmadaki etkilerine dair güçlü kanıtlar sunmuştur. Fare periodontit modelinde elde edilen sonuçlar, PDA NP'lerinin ROS'ları etkili bir şekilde ortadan kaldırarak periodontal iltihabı azaltmada güçlü bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir [42]. Oroujeni ve ark. hidrofobik ilaçlar için Fe₃O₄ nanopartiküllerinin yüzeyini PDA ile kaplanmış ve ardından 6-tio-β-siklodekstrin (6-tio-β-CD) ile fonksiyonlayarak yeni bir manyetik nano ilaç taşıyıcı sistem geliştirmişlerdir. Etkin madde olarak antiinflamatuvar etkili diklofenak kullanılmıştır. Hazırlanan nanopartiküllere diklofenak, etkin bir şekilde yüklenmiştir. İlaç yüklü β-CD-PDA manyetik nanopartiküller etkin maddenin daha uzun süre salım yapmasını sağlamıştır. Siklodekstrin ve PDA kaplı Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerin optimize edilmiş ilaç salım hızına sahip sistemler geliştirilmesini sağladığı görülmüştür [43].

Teranostik Alanda PDA

Teranostik, tedavi ve teşhisin birleşimini ifade eder. PDA, yüzeyi fonksiyonel yapma özelliği sayesinde farklı görüntüleme ajanlarını (MRI kontrast metal iyonları, radyonüklidler, fotosensitizörler, florokromlar) bağlamak için kullanılabilir. Bu bağlama işlemi, fiziksel bağlama yöntemleri (π - π yığılma veya hidrojen bağı) veya kimyasal bağlama yöntemleri (Michael ilavesi veya Schiff bazı reaksiyonları) kullanılarak gerçekleştirilebilir. Ayrıca, PDA modifikasyonu, tanı ajanları yüklü nanopartiküllere biyouyumluluk özelliği kazandırarak bu sayede yan etkilerin azaltılmasını sağlamaktadır. Bu sistemler tanı ve tedavi yöntemlerinin birleşimine imkan sağlar [11,44]. Konuyla ilgili yapılan bir çalışmada, indosyanin yeşili (ICG) ve PDA ile oluşturulan ICG@PDA nanopartiküllerinin teranostik etkisi incelenmiştir. Bu nanopartiküller, biyouyumlu ICG@PDA@PEG nanopartikülleri haline getirilmiştir. Rahim ağzı tümörü taşıyan fareler üzerinde yapılan *in vivo* deneyler, ICG@PDA@PEG nanopartiküllerinin tümörleri etkili bir şekilde küçülttüğünü göstermiştir. Bu çalışma, kanser tedavisi için güvenli ve etkili bir fototermal tedavi yöntemi geliştirmeye ve de teranostik uygulamalara örnek oluşturmaktadır [45].

Doku Onarımı

Doku yenilenmesi; hücre oluşumunun düzenlenmesi, hücre çoğalması ve farklılaşmasının sağlanması, bakteriyel enfeksiyonların önlenmesi gibi hücresel ve dokusal yanıtların düzenlenmesini gerektirir. PDA özel yapısı ve bileşenleri sayesinde, hücre yenilenmesini hızlandırmaktadır. Sert doku özellikle kemik dokusu merkezli onarımları içerir. PDA, bazı implante yapıların yüzeylerine uygulanan bir kaplama olarak, osteoblast aktivitesini büyük ölçüde etkilemektedir. İmplantların biyolojik uyumu ve başarısı, implant yüzeyine kemik hücrelerinin tutunma, çoğalma ve farklılaşma yeteneğine bağlıdır. PDA kaplamaları, implant yüzeyini daha hidrofilyk hale getirir ve çeşitli hücre tiplerinin implanta uyumunu artırır. PDA'nın osteoblast kökenli mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını artırdığı gösterilmiştir [46]. Ayrıca PDA, hücrelerin ekstrasellüler matriks gibi davranmasını teşvik ederek yeni kemik oluşumunu hızlandırabilir. Bunu implant yüzeyine hidroksiapatit birikmesini uyarak gerçekleştirir. PDA, biyolojik bileşenlerin implant yüzeyine bağlanması için bir ortam olarak kullanılabilir ve güçlü kovalent etkileşimleri sayesinde dayanıklı bir kaplama oluşturur. Wang ve ark. yaptıkları çalışmada, PDA kaplamaların kemik hücreleri ile etkileşimini ve osteoblast aktivitesini artırdığını göstermişlerdir. PDA kaplamanın; kemik iliği kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerde biyoadezyon, çoğalma ve osteojenik farklılaşma üzerinde doğrudan bir etki yaptığını göstermişlerdir. *In vivo* çalışma ile, PDA kaplamanın yeni kemik oluşumunu önemli ölçüde hızlandırdığını göstermişlerdir [47]. Yumuşak doku yara iyileşmesinin hızlandırılması, re-epitelizasyonun teşvik edilmesi, anjiyogenezin artırılması, hücre dışı matriksin yeniden düzenlenmesi, bakteriyel enfeksiyonun önlenmesi ve mezenkimal kök hücrelerin göçünün artırılması gibi karmaşık bir süreci içerir [11]. PDA'nın yumuşak doku onarımında kullanıldığı bir çalışmada, PDA kaplı kitosan/kalsiyum pirofosfat hibrit mikroçiçeklerin (PDA@CS-CaP), hemostatik ajan olarak etkisi incelenmiştir. Yüzey özellikleri ve kimyasal yapısı detaylı bir şekilde incelenen bu mikroçiçekler, yüksek hidrofilyklikleri, kimyasal aktivasyonları ve çiçek benzeri gözenekli hiyerarşik yapıları sayesinde kan hücreleri ve trombositlerin agregasyonunu sağlayarak kan pıhtılaşmasını hızlandırıp, kanamayı kontrol etme özelliğine sahip bulunmuştur [48].

PDA Modifikasyonunun Nanopartikül İlaç Taşıyıcı Sistemde Avantaj ve Dezavantajları

PDA modifikasyonu nanopartikül sistemlere pek çok avantaj kazandırsa da dezavantajları da bilinerek daha etkin kullanım sağlanmalıdır.

PDA modifikasyonunun nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemlere kazandırdığı pek çok avantaj bulunmaktadır:

- PDA'nın sentezi basit bir süreçtir ve organik çözücülere ihtiyaç duymaz. Ayrıca işlem basamağı azdır.
- Sentezde bazı kritik parametreler değiştirilerek farklı boyutlarda partiküller elde edilebilir. pH, sıcaklık, dopamin konsantrasyonu, oksitleyiciler ve reaksiyon süresi gibi temel parametreleri değiştirerek PDA yüzey modifikasyonunu kontrol etmek mümkündür. Bu kontrol, nanopartiküllerin özellikleri açısından, örneğin partikül boyutu veya film kalınlığı gibi çeşitli özellikleri hassas bir şekilde ayarlamayı mümkün kılar. Sy ve ark. yaptıkları çalışmada farklı polimerasyon süresi ve farklı dopamin konsantrasyonları kullanarak Au@PDA NP'ler sentezlemişlerdir. Bu iki parametrenin oluşan NP'ler üzerinde morfolojik farklılıklar ve farklı hücre içi alım özelliği gösterdiğini kanıtlamışlardır. Çalışma, PDA kaplı nano yapıların morfoloji ve hücresel etki derecesini ayarlama konusunda dopamin konsantrasyonu ve polimerizasyon süresinin önemini vurgulamaktadır [49].
- İlaç yükleme kapasitesi yüksektir. İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanıldığında, nanopartiküllerin ilaç yükleme kapasitesini önemli ölçüde artırabilirler. Bu durum, PDA'nın yapısında bulunan zengin katekol/kinon grupları sayesinde gerçekleşir.
- Nanopartikül yüzeyini modifikasyona açık hale getirirler ve çok işlevli nanopartiküller geliştirme imkânı sağlarlar. Ayrıca, PDA'nın yardımıyla pegilasyon gibi ikincil modifikasyonları kolayca gerçekleştirmek mümkündür [31].
- Biyouyumlu ve biyobozunurlardır. PDA modifikasyonu nanopartiküllere artmış hidrofilyte, biyouyumluluk, biyobozunurluk, güçlü fototermal dönüşüm kapasitesi ve reaktif oksijen türlerini temizleme yeteneği kazandırır [10].

• Tüm bu özellikler, nanopartikülleri çok işlevli hale getirir, bu da hedefleme, görüntüleme, kimyasal tedavi, fotodinamik tedavi, fototermal tedavi, yeniden doku oluşturma yeteneği, antiinflamatuar ve antioksidan etkiler gibi bir dizi faydayı beraberinde getirir [50].

PDA modifikasyonunun dezavantajları olarak ise şunlar sıralanabilir:

■ İmmünojenite ve hücrelerle etkileşim durumu ile ilgili yeterli çalışma yoktur. Dopaminin kendisi bir nörotransmitter olarak işlev gösterdiğinden, PDA'nın insan vücudundaki biyodegradasyon süreci, insan hücreleri ile etkileşimi ve immünojenitesi araştırılmalıdır.

■ Biyodegradasyon süreci tam olarak aydınlatılmamıştır. İlaç salımını optimize etmek, biyodağılım ve uzun vadeli toksisitenin analiz edilmesi, PDA'nın *in vivo*'da metabolizma ve biyodegradasyon mekanizmalarını anlamak ve PDA nanopartiküllerinin serum proteinleri ile etkileşiminin belirlenmesi gerekmektedir [51].

■ Polimerizasyon mekanizması tam olarak açığa çıkarılamamıştır. Ayrıca, etkinliği artırmak için PDA'nın polimerizasyon mekanizmasının ve kesin yapısının anlaşılmasına yönelik daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır [52].

PDA'nın Toksikite Profili

Dopamin, biyolojik olarak aktif bir nörotransmitterdir ve dopamin moleküllerinin hücreler ve dokularla teması olumsuz etkiler yaratabilir. Özellikle, kan veya dokuda kontrolsüz dopamin salımı çeşitli beklenmeyen toksik sonuçlara neden olabilir. Fakat yapılan çalışmalar bu toksisitenin düşük düzeyde olduğunu göstermiştir. Yapılan bir çalışmada PDA yapısına PEG konjuge edildiğinde *in vivo* toksisite göstermediği görülmüştür [53]. PDA işlevselleştirilmesi, yüzeylerde biyoyumlu nanokatmanların oluşumu nedeniyle enjekte edilen veya implante edilen materyallerin *in vivo* toksisitesini azaltmak için yararlı sistemler olarak görülmektedir. PDA'nın implante sistemlerde biyoyumluluğu artırdığı ve metal toksisitesini engellediği görülmüştür. PDA; nano yapılardan çıkan toksik iyonları yakalayarak, kan toksisitesini azaltmıştır [54]. Liu ve ark. tarafından yapılan çalışmada AuNP'ler PDA ile kaplanarak Au-PDA NP'ler oluşturulmuştur. *In vitro* deneyler, Au-PDA NP'lerin düşük sitotoksositeye sahip olduğunu ve kanser hücrelerine rahatça geçiş yaptığını göstermiştir. Transmisyon Elektron Mikroskopi (TEM) analizi, Au-PDA NP'lerin hücreler içinde 24 saat boyunca sağlam kaldığını doğrulamıştır. Ayrıca bu nanopartiküllerin karaciğer ve dalakta farklı hücreler tarafından alındığı ve en az altı hafta stabil kaldığı tespit edilmiştir. AuNP'lerin uzun süreli kullanımda farelerin ana organlarına toksik etkisi olmadığı bulunmuştur [55]. PDA'nın toksisite profilinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, PDA NP'lerin kanser hücreleri üzerinde daha yüksek sitotoksosite gösterirken, sağlıklı hücreler üzerinde daha az toksik etki gösterdiği görülmüştür. PDA, demir iyonlarına (Fe^{+3}) yüksek bağlanma afinitesine sahiptir, PDA NP'lerin yüksek ROS üretimi ile ilişkilendirildiği bu mekanizmanın, demir içeriği ile ilişkili olarak hücrel toksisiteye katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Kanser hücrelerinde bol bulunan Cu^{+2} ve Fe^{+3} iyonlarına yüksek afinite gösteren PDA, bu hücrelerde toksisite göstermiştir. PDA NP'lerinin *in vivo* toksisite profili, organ ve doku hasarı göstermeden kabul edilebilir sınırlar içinde kalmıştır. Bununla birlikte, uzun süreli kullanım ve yüksek dozlar hakkında daha fazla araştırma gerektiği önerilmiştir [56]. Bazı çalışmalarda, PDA'nın çözeltilerde semikinon radikalleri ve bazı serbest radikaller üretebildiği görülse de bu durum, ihmal edilebilir toksisite olarak görülmüştür [57].

Literatür örnekleri genel olarak, PDA polimerlerinin en azından küçük deney hayvanları ölçeğinde, canlı dokular için toksik olmadığını göstermektedir. Ancak, daha büyük ölçekte yapılacak *in vivo* toksisite değerlendirmelerinin devam etmesi kritik öneme sahiptir.

Patent Çalışmaları

Polidopamin NP'ler ile ilgili patent araştırmalarına bakıldığında çok çeşitli konuları içerdiği görülmektedir. Bu bölümde birkaç tanesi örnek mahiyetinde verilecektir. İleriki çalışmalarda bu alana duyulan ilgi sebebiyle daha çok patent çalışması yapılması beklenmektedir.

Katekolamin-PDA kullanımı ile yüzey malzemesi üzerinde azot monoksit içeren film hazırlama yöntemi: Bu çalışma, PDA kullanarak vücuda yerleştirilerek kontrollü azot monoksit salımına uygun bir sistem geliştirilmiştir. Bu sistemin; stent, kateter, subkutan implant, kimyasal sensör, kalp pili,

vasküler greft, yara pansumanı, penil implant, implant edilebilir kalp defibrilatörü ve sinir uyarıcısı gibi vücuda implante edilebilir alanlarda kullanılabileceği belirtilmiştir [58].

Lenf nodu takibi için polidopamin nanopartikül çözeltisinin hazırlanması ve uygulanması: Çalışmanın amacı, yüksek biyolojik güvenliğe sahip olan ve lenf düğümünü doğru bir şekilde belirleyebilen PDA nanopartiküler sistem geliştirmektir. Yakın kızılötesi ışık ile lenf düğümü kesin görüntülemesi yapılabilmekte ve keşfedilmemiş diğer küçük lenf düğümleri izlenebilmektedir, böylece tümör dokusu etrafındaki lenf düğümleri tamamen temizlenebilmektedir. Çalışmada PDA NP'ler, Tris HCl ortamında dopamin hidroklorür ilavesiyle hazırlanmıştır. Dopamin hidroklorür, farklı Tris-HCl tampon çözelti konsantrasyonları ve pH değerleri ile karıştırılarak farklı konsantrasyonlarda PDA NP'ler hazırlanmıştır. Hazırlanan PDA NP'ler taramalı elektron mikroskopu kullanılarak karakterize edilmiştir. Örnekler 150-300 nm boyutlarında bulunmuştur. Çalışma sonuçları, PDA NP'lerin hücreler için iyi bir biyoyumluluğa sahip olduğunu ve lenf nodlarını izleme gereksinimlerini karşılayabileceğini göstermiştir [59].

İlaç yüklü hyaluronik asit ve polidopamin ile modifiye edilmiş mezoporöz polidopamin nanopartikül hazırlama yöntemi: Çalışma; ilaç yüklü, hyaluronik asit ve polidopamin ile modifiye edilmiş mezoporöz polidopamin nanopartikül hazırlama yöntemini içerir. Öncelikle mezoporöz yapı sentezlenmiş, ardından dosetaksel yüklemesi yapılmış, polidopamin tabakasının oluşturulması ve hyaluronik asit moleküllerinin modifikasyonu yoluyla hem pasif hedeflemeye hem de aktif hedeflemeye sahip olan nanopartiküller geliştirilmiştir. Bu nanopartiküller, tümör tedavisinde kullanım için; kolay hazırlanan, güvenli, etkili ve geniş uygulama potansiyeline sahip bir sistem olarak belirtilmiştir [60].

Tümör antijeni yüklü polidopamin nanopartikülü hazırlama yöntemi ve uygulaması: Çalışma, tümör antijenlerini yüklemek için kullanılan bir PDA nanopartikülü ve hazırlama yöntemi ile ilgilidir. Tümör antijeni yüklü PDA nanopartikülü, tümör antijenlerinin Michael ilavesi ve Schiff bazı reaksiyonları aracılığıyla PDA nanopartiküllerinin yüzeylerine kovalent olarak bağlanmasıyla hazırlanır. Tümör antijeni, belirli tümör antijen peptit parçası, tümör hücresi lizati, belirli tümör antijeni DNA parçası ve yardımcı CpG'den (cytosine-phosphate-guanine) bir veya daha fazlasını içerebilir. Hazırlanan tümör antijeni yüklenmiş PDA NP'lerin iyi biyoyumluluğa sahip olduğu, vücut içi anti-tümör bağışıklığı etkili bir şekilde aktive edebildiği, tümör hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde inhibe edebildiği, tümör mikroçevresini iyileştirebildiği görülmüştür. Ayrıca insan vücudunun anti-tümör aktivitesini daha da artırabileceği, tümörün immünoterapisi için kullanılabileceği belirtilmiştir [61].

CpG, sitozin (C) ve guanin (G) nükleotitlerinin belirli bir sıralama düzeni ile birleştiği bir DNA dizisini ifade eder. Bu özel sıralama düzeni, birbirini takip eden bir sitozin ve bir guaninin yan yana gelmesi şeklinde gerçekleşir. CpG dinükleotidi olarak adlandırılan bu özel sıralama, genellikle DNA moleküllerinde bulunur. CpG dinükleotitleri, immünojenik yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Özellikle bağışıklık sisteminin işlevini düzenleyen moleküler mekanizmalarda CpG dinükleotitleri, birçok hücrel yanıtı uyarabilir. Bu nedenle CpG, immünoterapi ve aşı geliştirme gibi tıbbi uygulamalarda önemli bir rol oynar. CpG, bağışıklık sisteminin tümöre karşı tepki vermesini artırmak için kullanılabilir [62].

pH ve yakın kızılötesi ışık uyaranlı ilaç salımına sahip kompozit lif hazırlama yöntemi ve uygulaması: Çalışma, pH ve yakın kızılötesi ışık uyaranlı ilaç salımı için bir kompozit lif hazırlama yöntemi ve uygulaması ile ilgilidir. İlaç yüklü PDA NP'lerin çapı 50-80 nm'dir. Hazırlama yöntemi, PCL (Polikaprolakton) ve jelatin karışımından oluşan elektroçekilmiş liflerin sentezlenmesi ve hazırlanması, PDA NP'lerin hazırlanması, kemoterapi ilacı adriamisin ve PDA NP'lerin bir araya getirilmesi ve birleştirilmiş nanopartiküllerin PCL jelatin elektroçekilmiş lifler üzerine yüklenmesi adımlarını içerir. Buluşun kompozit lifi basit bir sentez yöntemine sahiptir ve büyük ölçekte hazırlanması kolaydır. Kemoterapi ilacı yüklenme miktarı yüksektir, pH ve yakın kızılötesi ışık ile uyarılma sonucu ilaç salımı gerçekleşir ve foto-termal tedavi ve kemoterapinin sinerjik etkisiyle daha iyi bir tümör tedavisi sağlayacağı belirtilmiştir [63].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu derlemede, PDA sentezi, özellikleri ve çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisindeki potansiyel uygulamaları özetlenmiştir. PDA temelli nano sistemler, güçlü biyoadezyon, yüksek biyoyumluluk,

fototermal etki, düşük toksisite ve ilaç yükleme kapasitesi gibi avantajlar sağlamaktadır. Hedefleme, görüntüleme, kimyasal tedavi, fotodinamik-fototermal tedavi, doku rejenerasyonu ve anti-inflamatuvar etki gibi; çeşitli uygulamalardaki ilerlemelerine rağmen, klinik kullanıma geçmeden önce çözülmesi gereken birkaç sorun bulunmaktadır. Bu sorunlar; PDA nanopartiküllerin boyut kontrolü, kaplama kalınlığının etkisi, sistem stabilitesi, ilaç salım optimizasyonu, biyodağılım ve uzun vadeli toksisite analizi, PDA'nın metabolizma ve biyodegradasyon mekanizmalarının anlaşılması, serum proteinleri ile etkileşim ve etkileri olarak sıralanabilir.

Gelecekteki çalışmalarla, istenilen boyutlarda ve istenilen etkiye sahip PDA nanopartiküllerin nasıl üretileceğine dair daha çok çalışma yapılması beklenmektedir. PDA nanosistemlerin kaplama kalınlığını kontrol etmek ve bu kalınlığın terapötik etki üzerindeki etkisini incelemek, daha kararlı, agregasyona daha az eğilimli PDA nanopartiküller sistemlerin geliştirilmesini sağlayarak bu alandaki ilerlemelere katkı sunacaktır.

YAZAR KATKILARI

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

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Phan, H.T., Haes, A.J. (2019). What does nanoparticle stability mean. *The Journal of Physical Chemistry C*, 123(27), 16495-16507. [\[CrossRef\]](#)
2. Rosli, N.A., Teow, Y.H., Mahmoudi, E. (2021). Current approaches for the exploration of antimicrobial activities of nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials*, 22(1), 885-907. [\[CrossRef\]](#)
3. Lee, H., Dellatore, S.M., Miller, W.M., Messersmith, P.B. (2007). Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science*, 318(5849), 426-430. [\[CrossRef\]](#)
4. Li, H., Yin, D., Li, W., Tang, Q., Zou, L., Peng, Q. (2021). Polydopamine-based nanomaterials and their potentials in advanced drug delivery and therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 199, 111502. [\[CrossRef\]](#)
5. Jin, A., Wang, Y., Lin, K., Jiang, L. (2020). Nanoparticles modified by polydopamine: Working as “drug” carriers. *Bioactive Materials*, 5(3), 522-541. [\[CrossRef\]](#)
6. Hong, S., Na, Y.S., Choi, S., Song, I.T., Kim, W.Y., Lee, H. (2012). Non-covalent self-assembly and covalent polymerization co-contribute to polydopamine formation. *Advanced Functional Materials*, 22(22), 4711-4717. [\[CrossRef\]](#)
7. Yu, F., Chen, S., Chen, Y., Li, H., Yang, L., Chen, Y., Yin, Y. (2010). Experimental and theoretical analysis of polymerization reaction process on the polydopamine membranes and its corrosion protection properties for 304 Stainless Steel. *Journal of Molecular Structure*, 982(1-3), 152-161. [\[CrossRef\]](#)
8. Chinchulkar, S.A., Patra, P., Dehariya, D., Yu, A., Rengan, A.K. (2022). Polydopamine nanocomposites and their biomedical applications: A review. *Polymers for Advanced Technologies*, 33(12), 3935-3956. [\[CrossRef\]](#)
9. Batul, R., Tamanna, T., Khaliq, A., Yu, A. (2017). Recent progress in the biomedical applications of polydopamine nanostructures. *Biomaterials Science*, 5(7), 1204-1229. [\[CrossRef\]](#)
10. Liebscher, J., Mrówczyński, R., Scheidt, H.A., Filip, C., Hädade, N.D., Turcu, R., Bende, A., Beck, S. (2013). Structure of polydopamine: A never-ending story?. *Langmuir*, 29(33), 10539-10548. [\[CrossRef\]](#)
11. Dreyer, D.R., Miller, D.J., Freeman, B.D., Paul, D.R., Bielawski, C.W. (2012). Elucidating the structure of poly (dopamine). *Langmuir*, 28(15), 6428-6435. [\[CrossRef\]](#)
12. Ding, Y.H., Floren, M., Tan, W. (2016). Mussel-inspired polydopamine for bio-surface functionalization. *Biosurface and Biotribology*, 2(4), 121-136. [\[CrossRef\]](#)
13. Delparastan, P., Malollari, K.G., Lee, H., Messersmith, P.B. (2019). Direct evidence for the polymeric nature of polydopamine. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(4), 1077-1082. [\[CrossRef\]](#)

14. Singh, I., Dhawan, G., Gupta, S., Kumar, P. (2021). Recent advances in a polydopamine-mediated antimicrobial adhesion system. *Frontiers in Microbiology*, 11, 607099. [\[CrossRef\]](#)
15. Liu, Y., Ai, K., Lu, L. (2014). Polydopamine and its derivative materials: Synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields. *Chemical Reviews*, 114(9), 5057-5115. [\[CrossRef\]](#)
16. Zhao, X., Zhao, J., Lin, Z.Y.W., Pan, G., Zhu, Y., Cheng, Y., Cui, W. (2015). Self-coated interfacial layer at organic/inorganic phase for temporally controlling dual-drug delivery from electrospun fibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 130(1), 1-9. [\[CrossRef\]](#)
17. Lu, J., Cai, L., Dai, Y., Liu, Y., Zuo, F., Ni, C., Shi, M., Li, J. (2021). Polydopamine-based nanoparticles for photothermal therapy/chemotherapy and their synergistic therapy with autophagy inhibitor to promote antitumor treatment. *The Chemical Record*, 21(4), 781-796. [\[CrossRef\]](#)
18. Mrówczyński, R., Jurga-Stopa, J., Markiewicz, R., Coy, E.L., Jurga, S., Woźniak, A. (2016). Assessment of polydopamine coated magnetic nanoparticles in doxorubicin delivery. *Royal Society of Chemistry Advances*, 6(7), 5936-5943. [\[CrossRef\]](#)
19. Xue, P., Sun, L., Li, Q., Zhang, L., Guo, J., Xu, Z., Kang, Y. (2017). PEGylated polydopamine-coated magnetic nanoparticles for combined targeted chemotherapy and photothermal ablation of tumour cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 160, 11-21. [\[CrossRef\]](#)
20. Black, K.C., Yi, J., Rivera, J.G., Zelasko-Leon, D.C., Messersmith, P.B. (2012). Polydopamine-enabled surface functionalization of gold nanorods for cancer cell-targeted imaging and photothermal therapy. *Nanomedicine*, 8(1), 17-28. [\[CrossRef\]](#)
21. Chaturvedi, M., Patel, M., Bisht, N., Shruti-Das Mukherjee, M., Tiwari, A., Mondal, D.P., Srivastava, A.K., Dwivedi, N., Dhand, C. (2023). Reduced graphene oxide-polydopamine-gold nanoparticles: A ternary nanocomposite-based electrochemical genosensor for rapid and early *Mycobacterium tuberculosis* detection. *Biosensors*, 13(3), 342. [\[CrossRef\]](#)
22. Li, W., Cao, Z., Yu, L., Huang, Q., Zhu, D., Lu, C., Lu, A., Liu, Y. (2021). Hierarchical drug release designed Au@ PDA-PEG-MTX NPs for targeted delivery to breast cancer with combined photothermal-chemotherapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 1-15. [\[CrossRef\]](#)
23. Chiozzi, V., Rossi, F. (2020). Inorganic-organic core/shell nanoparticles: Progress and applications. *Nanoscale Advances*, 2(11), 5090-5105. [\[CrossRef\]](#)
24. Duo, Y., Li, Y., Chen, C., Liu, B., Wang, X., Zeng, X., Chen, H. (2017). DOX-loaded pH-sensitive mesoporous silica nanoparticles coated with PDA and PEG induce pro-death autophagy in breast cancer. *Royal Society of Chemistry Advances*, 7(63), 39641-39650. [\[CrossRef\]](#)
25. Kim, S.M., Patel, M., Patel, R. (2021). PLGA core-shell nano/microparticle delivery system for biomedical application. *Polymers*, 13(20), 3471. [\[CrossRef\]](#)
26. Zhou, J., Wang, P., Wang, C., Goh, Y.T., Fang, Z., Messersmith, P.B., Duan, H. (2015). Versatile core-shell nanoparticle@ metal-organic framework nanohybrids: Exploiting mussel-inspired polydopamine for tailored structural integration. *American Chemistry Society Nano*, 9(7), 6951-6960. [\[CrossRef\]](#)
27. Tran, H.Q., Batul, R., Bhave, M., Yu, A. (2019). Current advances in the utilization of polydopamine nanostructures in biomedical therapy. *Biotechnology Journal*, 14(12), 1900080. [\[CrossRef\]](#)
28. Black, K.C., Sileika, T.S., Yi, J., Zhang, R., Rivera, J.G., Messersmith, P.B. (2014). Bacterial killing by light-triggered release of silver from biomimetic metal nanorods. *Small*, 10(1), 169-178. [\[CrossRef\]](#)
29. Chen, C., Tang, W., Jiang, D., Yang, G., Wang, X., Zhou, L., Zhang, W., Wang, P. (2019). Hyaluronic acid conjugated polydopamine functionalized mesoporous silica nanoparticles for synergistic targeted chemo-photothermal therapy. *Nanoscale*, 11(22), 11012-11024. [\[CrossRef\]](#)
30. Hou, J., Guo, C., Shi, Y., Liu, E., Dong, W., Yu, B., Liu, S., Gong, J. (2017). A novel high drug loading mussel-inspired polydopamine hybrid nanoparticle as a pH-sensitive vehicle for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 533(1), 73-83. [\[CrossRef\]](#)
31. Mandriota, G., Di Corato, R., Benedetti, M., De Castro, F., Fanizzi, F.P., Rinaldi, R. (2018). Design and application of cisplatin-loaded magnetic nanoparticle clusters for smart chemotherapy. *American Chemical Society Applied Materials & Interfaces*, 11(2), 1864-1875. [\[CrossRef\]](#)
32. Heris, N.N., Baghani, L., Khonsari, F., Varshochian, R., Dinarvand, R., Atyabi, F. (2023). Delivery of EGFR-siRNA to prostatic cancerous cells based on polydopamine coated gold nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 87, 104869. [\[CrossRef\]](#)
33. Mu, X., Zhang, F., Kong, C., Zhang, H., Zhang, W., Ge, R., Liu, Y., Jiang, J. (2017). EGFR-targeted delivery of DOX-loaded Fe₃O₄@ polydopamine multifunctional nanocomposites for MRI and antitumor chemo-photothermal therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 2899-2911. [\[CrossRef\]](#)
34. Sezgin, S.N. (2022). Yüksek Lisans Tezi. Polidopamin Bazlı Teranöstitik Taşıyıcıların Geliştirilmesi. Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Mühendislik Fakültesi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye.

35. Singh, I., Priyam, A., Jha, D., Dhawan, G., Gautam, H.K., Kumar, P. (2020). Polydopamine-aminoglycoside nanoconjugates: Synthesis, characterization, antimicrobial evaluation and cytocompatibility. *Materials Science and Engineering: C*, 107, 110284. [\[CrossRef\]](#)
36. Taşdemir, D. (2020). Yüksek Lisans Tezi. Hedefli fototerma ve fotodinamik terapi: DNA aptamer fonksiyonlaştırılmış indosiyanın yeşili katkı polidopaminin sentezlenmesi ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'un yok edilmesi için kullanımı. Analitik Kimya Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, Türkiye.
37. Hu, D., Zou, L., Li, B., Hu, M., Ye, W., Ji, J. (2019). Photothermal killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by bacteria-targeted polydopamine nanoparticles with nano-localized hyperpyrexia. *American Chemical Society Biomaterials Science & Engineering*, 5(10), 5169-5179. [\[CrossRef\]](#)
38. Zhang, M., Huang, Y., Pan, W., Tong, X., Zeng, Q., Su, T., Qi, X., Shen, J. (2021). Polydopamine-incorporated dextran hydrogel drug carrier with tailorable structure for wound healing. *Carbohydrate Polymers*, 253, 117213. [\[CrossRef\]](#)
39. Lim, K., Chua, R.R.Y., Ho, B., Tambyah, P.A., Hadinoto, K., Leong, S.S.J. (2015). Development of a catheter functionalized by a polydopamine peptide coating with antimicrobial and antibiofilm properties. *Acta Biomaterialia*, 15, 127-138. [\[CrossRef\]](#)
40. Wang, L., Wang, Z., Pan, Y., Chen, S., Fan, X., Li, X., Chen, G., Ma, Y., Cai, Y., Zhang, J., Yang, H., Xiao, W., Yu, M. (2022). Polycatechol-derived mesoporous polydopamine nanoparticles for combined ROS scavenging and gene interference therapy in inflammatory bowel disease. *American Chemical Society Applied Materials & Interfaces*, 14(17), 19975-19987. [\[CrossRef\]](#)
41. Hu, J., Yang, L., Yang, P., Jiang, S., Liu, X., Li, Y. (2020). Polydopamine free radical scavengers. *Biomaterials Science*, 8(18), 4940-4950. [\[CrossRef\]](#)
42. Bao, X., Zhao, J., Sun, J., Hu, M., Yang, X. (2018). Polydopamine nanoparticles as efficient scavengers for reactive oxygen species in periodontal disease. *American Chemical Society Nano*, 12(9), 8882-8892. [\[CrossRef\]](#)
43. Oroujeni, M., Kaboudin, B., Xia, W., Jönsson, P., Ossipov, D.A. (2018). Conjugation of cyclodextrin to magnetic Fe₃O₄ nanoparticles via polydopamine coating for drug delivery. *Progress in Organic Coatings*, 114, 154-161. [\[CrossRef\]](#)
44. Acter, S., Moreau, M., Ivkov, R., Viswanathan, A., Ngwa, W. (2023). Polydopamine nanomaterials for overcoming current challenges in cancer treatment. *Nanomaterials*, 13(10), 1656. [\[CrossRef\]](#)
45. Du, Z., Ma, R., Chen, S., Fan, H., Heng, Y., Yan, T., Alimu, G., Zhu, L., Zhan, X., Alifu, N., Ma, C. (2022). A highly efficient polydopamine encapsulated clinical ICG theranostic nanoplatfor for enhanced photothermal therapy of cervical cancer. *Nanoscale Advances*, 4(18), 4016-4024. [\[CrossRef\]](#)
46. Wang, L., Liu, S., Ren, C., Xiang, S., Li, D., Hao, X., Ni, S., Chen, Y., Zhang, K., Sun, H. (2021). Construction of hollow polydopamine nanoparticle based drug sustainable release system and its application in bone regeneration. *International Journal of Oral Science*, 13(1), 27. [\[CrossRef\]](#)
47. Wang, H., Lin, C., Zhang, X., Lin, K., Wang, X., Shen, S.G. (2019). Mussel-inspired polydopamine coating: A general strategy to enhance osteogenic differentiation and osseointegration for diverse implants. *American Chemical Society Applied Materials and Interfaces*, 11(7), 7615-7625. [\[CrossRef\]](#)
48. Liu, S., Zheng, Z., Wang, S., Chen, S., Ma, J., Liu, G., Wang, B., Li, J. (2019). Polydopamine-coated chitosan/calcium pyrophosphate hybrid microflowers as an effective hemostatic agent. *Carbohydrate Polymers*, 224, 115175. [\[CrossRef\]](#)
49. Sy, K.H.S., Ho, L.W.C., Lau, W.C.Y., Ko, H., Choi, C.H.J. (2018). Morphological diversity, protein adsorption, and cellular uptake of polydopamine-coated gold nanoparticles. *Langmuir*, 34(46), 14033-14045. [\[CrossRef\]](#)
50. Lu, J., Cai, L., Dai, Y., Liu, Y., Zuo, F., Ni, C., Shi, M., Li, J. (2021). Polydopamine-based nanoparticles for photothermal therapy/chemotherapy and their synergistic therapy with autophagy inhibitor to promote antitumor treatment. *The Chemical Record*, 21(4), 781-796. [\[CrossRef\]](#)
51. Ho, C.C., Ding, S.J. (2014). Structure, properties and applications of mussel-inspired polydopamine. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(10), 3063-3084. [\[CrossRef\]](#)
52. Xiong, Y., Xu, Z., Li, Z. (2019). Polydopamine-based nanocarriers for photosensitizer delivery. *Frontiers in Chemistry*, 7, 471. [\[CrossRef\]](#)
53. Brubaker, C.E., Kissler, H., Wang, L.J., Kaufman, D.B., Messersmith, P.B. (2010). Biological performance of mussel-inspired adhesive in extrahepatic islet transplantation. *Biomaterials*, 31(3), 420-427. [\[CrossRef\]](#)
54. Hong, S., Kim, K.Y., Wook, H.J., Park, S.Y., Lee, K.D., Lee, D.Y., Lee, H. (2011). Attenuation of the *in vivo* toxicity of biomaterials by polydopamine surface modification. *Nanomedicine*, 6(5), 793-801. [\[CrossRef\]](#)

55. Liu, X., Cao, J., Li, H., Li, J., Jin, Q., Ren, K., Ji, J. (2013). Mussel-inspired polydopamine: A biocompatible and ultrastable coating for nanoparticles *in vivo*. *ACS Nano*, 7(10), 9384-9395. [\[CrossRef\]](#)
56. Nieto, C., Vega, M.A., Enrique, J., Marcelo, G., Martin del Valle, E.M. (2019). Size matters in the cytotoxicity of polydopamine nanoparticles in different types of tumors. *Cancers*, 11(11), 1679. [\[CrossRef\]](#)
57. He, X., Obeng, E., Sun, X., Kwon, N., Shen, J., Yoon, J. (2022). Polydopamine, harness of the antibacterial potentials-A review. *Materials Today Bio*, 15, 100329. [\[CrossRef\]](#)
58. Kim, W.J., Kim, J., Lee, H., Hong, S. (2017). Method of preparing coating film containing nitrogen monoxide on surface of material using catecholamine. US9623156B2.
59. Jianhui, L., Shuhan, W., Long, X., Yue, W. (2023). Polydopamine nanoparticle solution for lymph node tracing and preparation method and application thereof. CN115554422A.
60. Liangke, Z., Huan, C. (2022). Drug-loaded hyaluronic acid polydopamine-coated mesoporous polydopamine nanoparticle and preparation method thereof. CN111110652B.
61. Hailing, Z., Xigang, L., Xiaoli, W., Ning, W., Ying, Y. (2023). Tumor antigen-loaded polydopamine nanoparticle and preparation method and application thereof. CN111346236B.
62. Chen, W., Jiang, M., Yu, W., Xu, Z., Liu, X., Jia, Q., Guan, X., Zhang, W. (2021). CpG-based nanovaccines for cancer immunotherapy. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 5281-5299. [\[CrossRef\]](#)
63. Xiujun, C., Dong, C., Xiang, L., Junjie, X. (2021). Composite Fiber with pH and near-infrared light response drug release and preparation method and application thereof. CN111375060B.



SJÖGREN SENDROMUNDA GÜNCEL İLAÇ TEDAVİSİ

CURRENT DRUG TREATMENT IN SJÖGREN'S SYNDROME

Aybüke ÖZTÜRK¹ , Ebru UZUNHİSARCIKLİ^{2*} 

¹Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 38039, Kayseri, Türkiye

²Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, 38039, Kayseri, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu derleme çalışmasında Sjögren (Sikka) sendromuna ilişkin bugüne kadar elde edilen bulgulara ve tedavi yöntemlerine odaklanılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda Sjögren sendromunun epidemiyolojisi, klinik bulguları, tanı yöntemleri ve tedavisine yönelik, çoğunlukla gözlemsel, açık etiketli ve randomize klinik çalışmalardan elde edilen mevcut kanıtlar ile Pilocarpin ve Sevimele gibi muskarinik agonistler, antimalaryaller (Hidroksiklorokin); Metotreksat, Leflunomid, Azatioprin, Sülfasalazin, Mikofenolik asit ve Siklosporin gibi geleneksel biyolojik olmayan hastalığı modifiye eden antiromatizmal ilaçlar (DMARD'ler); ve aralarında alkilleyici ajan Siklofosfamid ve B hücrelerini hedef alan anti-CD20 antikoru Rituksimab'ın da bulunduğu diğer güçlü ajanlardan bahsedilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Hastalar, tanıyı doğrulamak ve hastalığın derecesini belirlemek için kapsamlı bir tedavi öncesi değerlendirmeye tabi tutulmalı ve buna göre terapötik yaşam tarzı değişiklikleri ile farmakolojik ajanlardan yararlanmalıdır. Orta ve şiddetli tutulumu olan hastalar genellikle klinik tabloya, dokulara ve etkilenen organ sistemine bağlı olarak immünsüpresiflerin ve biyolojik ajanların kullanımı da dahil olmak üzere sistemik tıbbi tedaviye ihtiyaç duymaktadırlar.

Anahtar Kelimeler: Alkilleyici ajan, DMARD, muskarinik agonist, Rituksimab

ABSTRACT

Objective: In this review study, it is aimed to focus on the findings and treatment methods obtained to date regarding Sjögren's (Sikka) syndrome. In this context, the available evidence on the epidemiology, clinical findings, diagnostic methods and treatment of Sjögren's syndrome, mostly obtained from observational, open-label and randomized clinical studies, and muscarinic agonists such as Pilocarpine and Sevimele, antimalarials (Hydroxychloroquine); traditional non-biological disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) such as Methotrexate, Leflunomide, Azathioprine, Sulfasalazine, Mycophenolic acid and Cyclosporine; and other potent agents are mentioned, including the alkylating agent Cyclophosphamide and the B-cell-targeting anti-CD20 antibody Rituximab.

Result and Discussion: Patients should undergo a comprehensive pre-treatment evaluation to confirm the diagnosis and determine the degree of the disease and benefit from therapeutic lifestyle changes and pharmacological agents accordingly. Patients with moderate to severe involvement generally require systemic medical treatment, including the use of immunosuppressants and biologic agents, depending on the clinical picture, tissues, and organ system affected.

Keywords: Alkylating agent, DMARD, muscarinic agonist, Rituximab

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ebru Uzunhisarcikli
e-posta / e-mail: eczebruozturk@gmail.com, Tel. / Phone: +903522076666-28276

GİRİŞ

Sjögren sendromu (SjS), başta tükürük ve gözyaşı bezleri olmak üzere, burun, üst solunum yolu, orofarenksi içeren mukozal yüzeylerde kuruluk şeklinde sikka semptomlarının geliştiği otoimmün kronik bir hastalıktır [1]. SjS'nin otoimmün etiopatogenetik temeli 1960'larda doğrulandı ve organa ek olarak SjS ile ilişkili antijen A (SSA; anti-Ro/SSA antikoru olarak da bilinir) ve SSB (ayrıca anti-La/SSB antikoru olarak da bilinir) otoantikoru varlığı spesifik lenfosit infiltrasyonu bu hastalığın patobiyolojisi ve tanısı için merkezi hale gelmiştir. O zamandan bu yana, SjS hakkındaki bilgiler önemli ölçüde ilerleme kaydetmiş olmasına rağmen bu hastalığın ilk yıllarda tanımlanan beş özelliği (sikka semptomlarının gelişimi, hastalığın sistemik tutulumu, ekzokrin bezlere lenfositik infiltrasyon, SjS hastalarında otoantikoru varlığı ve artan lenfoma riski) hala bu hastalığın karakteristik özelliğidir [2].

Geçtiğimiz 50 yılda, 'ikincil SjS' terimi başka bir sistemik otoimmün hastalık ile kombinasyon halinde SjS tanısı alan hastalar için kullanılmıştır. Bununla birlikte, bu terminoloji 'birincil SjS' ve 'ikincil SjS' olarak ayırım yapılması gerektiği tartışılmaktadır ve bunların ne zaman ve neden kullanılması gerektiği konusunda standartlaştırılmış kılavuzlar eksiktir. 'İkincil SjS' esas olarak eşlik eden sistemik otoimmün hastalıkları (romatoid artrit, sistemik skleroz veya sistemik lupus eritematosus (SLE)) olan hastalarda nadiren kullanılır. Ek olarak, bazı yazarlar SjS kriterlerini karşılamayan klinik kuruluğu olan hastalar için ve SLE hastaları ile romatoid artritli hastalar için 'ikincil SjS' kullanırken diğerleri için 'ilişkili SjS' gibi farklı terimlerin kullanılmasını önermişlerdir [1]. Aslında, birincil ve ikincil (veya ilişkili) SjS arasındaki ayırım, yalnızca diğer otoimmün hastalıkları olan hastalarda SjS'nin bir arada bulunması veya örtüşmesiyle ilgili sıklıkla rapor edilen klinik durumu yansıtmaktadır. Hasta yönetimiyle ilgili olarak, hastaları 'birincil' veya 'ikincil' SjS olarak bölmek hiçbir anlam ifade etmemektedir çünkü SjS yönetimi her iki hasta popülasyonunda da aynıdır [2].

Hastalığın patogenezinde yer alan mekanizmalara ilişkin yapılan araştırmalarla elde edilen ilerlemelere rağmen şu anda SjS'nun hedefe yönelik bir tedavisi mevcut değildir. Tedaviye, hastalığın aktivitesine ve ekstrasgladüler belirtilerin varlığına ve yaygınlığına göre bireysel olarak karar verilir. SjS'li hastalarda tedavi endikasyonu altta yatan hastalığa göre belirlenir. Genel olarak tedavi dış hekimlerinin yanı sıra aile hekimleri, romatologlar, göz doktorlarından oluşan interdisipliner bir ekip tarafından sağlanmalıdır. İlgili organlara ve mevcut semptomlara bağlı olarak diğer uzmanlara (jinekolog, göğüs hastalıkları uzmanı, nörolog, vb.) danışılması gerekebilir [3].

Bu derleme çalışması SjS ile ilgili bugüne kadar elde edilmiş olan bulgulara ve tedavi yöntemlerine odaklanmayı amaçlamıştır ve bu bağlamda SjS sendromunun epidemiyolojisi, hastalarda gözlemlenen klinik bulguları, tanı yöntemleri ve tedavisi için çoğunlukla gözlemsel, açık etiketli ve randomize klinik çalışmalardan elde edilen mevcut kanıtlara değinilmiştir.

Epidemiyolojisi

SjS'nin rapor edilen insidansı ve prevalansı hem çalışma tasarımına hem de kullanılan sınıflandırma kriterlerine göre değişmektedir [4]. 1993 Avrupa Sınıflandırma Kriterlerini kullanan çalışmalarda havuzlanmış yaygınlık oranları 2002 AECG kriterlerine göre, nüfusa dayalı epidemiyolojik çalışmalarda rapor edilen toplu yaygınlık oranları toplam nüfusta hesaplanandan biraz daha düşüktü. SjS'nin görülme sıklığı 100.000 kişi başına 3 ile 11 vaka arasında değişirken prevalansı %0.01 ile %0.728 arasında değişmektedir. Hiçbir zaman teşhis edilemeyen asemptomatik vakaların olması da muhtemeldir [5,6].

Günlük pratikte SjS ve diğer otoimmün hastalıklar sıklıkla bir arada görülmektedir (ilişkili SjS). Sistemik otoimmün hastalığı olan hastalarda SjS'li hastaların oranı eşlik eden hastalığa göre farklılık göstermektedir; SLE hastalarının %14-18'inde [7], romatoid artritli hastaların %7-17'sinde [8] ve sistemik sklerozlu hastaların %12'sinde [9] SjS görülmektedir. Klinik uygulamada, ilişkili SjS'nin yönetimi, birincil SjS'nin yönetimiyle benzer şekildedir.

Hastalığın Mekanizması ve Patolojisi

Bir bireyin genetik yatkınlığıyla etkileşime giren birden fazla çevresel faktör, SjS gelişimini etkileyebilir. Hem T hücrelerinin hem de B hücrelerinin, epitelyum tarafından ifade edilen ribonükleoprotein parçacıkları Ro/SSA ve La/SSB gibi otoantijenlere anormal yanıtlarının bir sonucu

olarak artan sitokin ve kemokin seviyeleri, ekzokrin bezlerinin kronik iltihaplanmasına ve sonunda fizyolojik fonksiyonlarının kaybına neden olur [10]. SjS'li hastalarda tükürük bezi epitel hücreleri (SGEC'ler), bağışıklık hücrelerinin birikmesine, aktivasyonuna ve farklılaşmasına aktif olarak aracılık ederek yerel otoimmün yanıtları yönlendirerek düzenler. Bağışıklık hücreleri ve inflamatuvar mikro-ortam, epitel hücrelerini daha da aktive eder veya hayatta kalmalarını düzenler, böylece SjS'de gözlenen otoimmün yanıtları sürdüren epitelyal hücre ve bağışıklık hücresi etkileşiminin kısır döngüsünü yaratır [11].

SjS'nin patogenezi açıklayan mevcut teori epitelyumun SjS'deki inflamasyonlu doku olduğunu ileri sürer. Ekzokrinopati ve bir organın fonksiyonel kısımlarının tutulumu, organları çevreleyen veya istila eden epitelyal hücrelerde lenfositik sızıntıların gelişimi ile ilişkilidir. Bu teoriye göre epitel hücreleri, atipik antijen sunan hücreler gibi davranarak otoimmün tepkinin merkezi düzenleyicileridir ve sadece bağışıklık hücrelerinin sızmasından etkilenen masum seyirciler değildir. Bununla birlikte, otoimmün epitelit, SjS'nin immünopatolojisi için yalnızca bir açıklama olmasına rağmen en çok desteklenen teorilerden biridir. Çeşitli çalışmalar aynı zamanda ekzokrin bezlerinin fonksiyonunda hormonların ve nöropeptitlerin etkisi ile ilişkili bir nöroendokrin mekanizmanın rolünü de öne sürmektedir [10].

Hastalığın Tanı ve Belirtileri

SjS, yavaş ilerleyen kronik bir otoimmün hastalıktır. Klinik bulgular son derece değişkendir; bu hastalığın ortaya çıkışı, organa özgü otoimmün bir hastalıktan, sistemik bir otoimmün hastalığa ve lenfoproliferatif bir duruma kadar değişebilir. Fiziki muayenede bariz bulgularla keratokonjonktivitis sikka, ağız kuruluğu varlığı bulunan bir hastada SjS tanısı konusunda önemli olan ekzaglandüler hastalığın boyutunu tespit etmek ve ihtiyaç duyulan tedaviyi net olarak belirlemektir. Daha hafif sikka semptomları olan ve daha az karakteristik antikor profilleri olan hastalarda tanı ve tedavisi zor olabilir. Tüm bu karışıklığa rağmen genel olarak sikka belirtileri arasında göz ve ağız kuruluğu SjS ile ilişkili klasik semptomlardır ve hastaların büyük çoğunluğunda mevcuttur. SjS'li hastalarda tükürük ve gözyaşı bezlerinin yanı sıra diğer ekzokrin bezleri de etkilenebilir. Kuruluk aynı zamanda burnu, üst solunum yollarını ve orofarinksini de etkileyebilir ve bu durum rinit sikka, kalıcı öksürük ve ses kısıklığına neden olabilir. Çoğu hastada bunlara ek olarak gözlenen kuruluk deride kserozis ve kadınlarda vajinal kuruluğa neden olabilmektedir [12].

Sistemik semptomlar SjS'nin ortaya çıkmasıyla ya da daha sonra gelişebilmektedir. Sistemik semptomlar SjS'nin karakteristik semptomlarının başlangıcından önce ortaya çıktığında veya tipik semptomlar hafif olduğunda, bu hastalığa gizli SjS veya SjS sikka dışı başlangıcı denir. SjS'nin sistemik semptomları ve komplikasyonları yaygın ve çeşitli olabilir; deri, eklem, pulmoner, kardiyovasküler, nefro-ürolojik, sinir ve hematolojik sistemler de dahil olmak üzere vücudun çoğu sisteminde tutulum yaparak etki gösterebilmektedir [13].

Tedavi Yöntemleri

SjS'nin semptomatik tedavisi genellikle sikka semptomlarının tedavisi ile sınırlıdır. Kuru gözlerin tedavisi için yüksek viskoziteli göz damlaları ve jellerden oluşan gözyaşı ikame tedavisi, mukusu eritmek için oral mukolitik ajanlarla kombinasyon halinde kullanımı temel tedavi yaklaşımıdır. SjS ile ilişkili şiddetli veya dirençli keratokonjonktivitis sikka hastalarına kısa süreli topikal antiinflamatuvar ajanlar uygulanması gerekebilir. SjS'nin oral yan etkilerini azaltmak için yapılması gereken en iyi koruma yöntemi ağız sağlığını korumak veya elde etmek için önleyici önlemlerin kullanılmasına ek olarak ağız yüzeylerinin nemlendirilmesine odaklanmaktadır [14]. Sistemik etkiye sahip ilaçlar, örneğin Pilocarpin ve Sevimele gibi sekretagoglar da sikka semptomlarının semptomatik tedavisi için kullanılabilir. Her iki ilaç da muskarinik reseptör agonistidir ve bir miktar fonksiyonel glandüler doku kalıntısı bulunan hastalarda tükürük ve lakrimal bez çıktılarında geçici bir artışa neden olmaktadır. Her iki ilaç da SjS hastalarında ağız ve göz kuruluğunun tedavisi için Amerika Birleşik Devletleri'nde ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır, ancak Sevimele'nin dünya çapında genel bir kullanımı yoktur. Bu ilaçların yaygın yan etkileri terleme, ateş basması, acil idrara çıkma ihtiyacı ve gastrointestinal rahatsızlıkları içerir, bu yan etkiler klinik uygulamalarını sınırlayabilmektedir.

Biyolojik Olmayan Tedavi

SjS tedavisinde kullanılan başlıca biyolojik olmayan ilaçlar kortikosteroidler ve Hidroksiklorokindir. SjS'yi tedavi etmek için Prednizolon kullanımı, diğer otoimmün hastalıkların tedavisindeki etkinliğine dayanmaktadır. Klinik deneyimlere dayanarak artrit ve kutanöz semptomların tedavisinde düşük doz Prednizolon kullanılmaktadır. Yüksek dozda Prednizolon, SjS üzerinde kontrolsüz çalışmalarda böbrek ve akciğer fonksiyon bozukluklarının tedavisinde etkinlik göstermiştir. Kortikosteroidlerin uzun süreli kullanımı osteoporoz, diyabet, kilo alma ve dislipidemi dahil olmak üzere yan etkilerle ilişkilidir [1]. Hidroksiklorokin'in terapötik etkisi, tip 1 interferonlar gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltarak doğuştan gelen bağışıklık tepkisini etkileyen TLR sinyalinin inhibisyonuna dayanır. IL6, IgG, eritrosit sedimentasyon hızı ve romatoid faktör gibi diğer serolojik parametrelere etki eder. Hidroksiklorokin, SLE ve romatoid artritli hastalarda semptomların azaltılması ve serolojik parametrelerin iyileştirilmesine dayalı olarak SjS'de idame tedavisi olarak kullanılır. Hidroksiklorokin'in başlıca yan etkileri, akomodasyon bozukluğuna bağlı bulanık görme, pigmentasyon ve görme alanı defekti ile birlikte retinopati, makulopati, kardiyomyopati, anoreksi, vertigo ve deri döküntüleridir [15].

Biyolojik Tedavi

Çeşitli biyolojik ajanlarla özellikle de B hücrelerini hedef alanlarla umut verici sonuçlar rapor edilmiştir. Rituksimab (CD20'ye özgü bir antikor) ile B hücre depleasyonu tedavisi, iki küçük RCT'de ve ayrıca kontrolsüz çalışmalarda yorgunluk da dahil olmak üzere SjS'nin bazı semptomlarını azaltmış ve tükürük akışını iyileştirmiştir. Kortikosteroidler, antihistaminikler ve Parasetamol ile ön tedaviye rağmen, bazı hastalarda hipergamaglobulinemi ile ilişkilendirilebilen serum hastalığı benzeri bir sendrom gelişip SjS'li hastaları antikimerik antikorların oluşumuna yatkın hale getirdiği görülmüştür. SjS yanıt indeksini uygulayan post hoc analiz Rituksimab ve plasebo grupları arasında yanıt oranında önemli bir fark olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın bulgularına rağmen, Rituksimab, lenfoma da dahil olmak üzere SjS'nin şiddetli ekstraplandüler belirtilerinin tedavisi için endikasyon dışı olarak reçete edilmektedir

B hücrelerini hedef alan diğer biyolojik tedaviler arasında Epratuzumab ve Belimumab yer alır. Epratuzumab, B hücresi antijen reseptör sinyali yoluyla etki eden ve kısmi B hücresi tükenmesine yol açan bir B hücresi reseptörü CD22'ye spesifik monoklonal antikordur. SjS'li hastalarda Epratuzumab yorgunluk üzerinde yararlı bir etki göstermektedir [16]. T hücresi hedeflemeyle ilgili olarak Abatacept (bir füzyon molekülü), B hücreleri ve T hücreleri de dahil olmak üzere antijen sunan hücreler arasındaki CD28 kostimülasyonunu önler. Abatacept'in ayrıca T hücreleri ve T hücresine bağımlı B hücresi aktivasyonunu inhibe ettiği de düşünülmektedir [17].

Lenfoma Tedavisi

Lenfoma tanısı konulduktan sonra, mevcut lenfoma alt tipine göre tedavi yaklaşımı planlanmalıdır. Bazı klinisyenler yalnızca ekzokrin bezleri etkileyen düşük dereceli lenfoma hastalarında dikkatli bir bekleme yaklaşımı önermektedir. Buna karşılık, yaygın MALT lenfoması olan veya eş zamanlı yüksek hastalık aktivitesine sahip olan hastalarda lenfomanın ilerleme riski yüksektir, bu nedenle hastalığın daha fazla ilerlemesini durdurmak için erken tedaviden fayda görebilirler.

Lenfomanın tedavisi için en iyi terapötik rejim, Rituksimabın; Siklofosamid, Klorambusil, Fludarabin ve/veya Bendamustin gibi alkilleyici ajanlarla kombinasyonudur. Rituksimab ve Bendamustin kombinasyonunun marjinal bölge ve MALT lenfomada etkili ve güvenli olduğu gösterilmiştir [18]. Diffüz büyük B hücreli lenfoma hastalarında tedavi, lenfomanın histolojik derecesine göre uyarlanmalı ve Rituksimabın; Siklofosamid, Doksorubisin, Vinkristin ve Prednizolon ile ilişkisine dayanmalıdır [19].

İlaç Tedavisine Genel Yaklaşım

Tedavi seçimi organ belirtilerine ve hastalığın şiddetine göre değişir:

- Göz kuruluğu, ağız kuruluğu ve diğer sikka semptomları – SjS olan hastalarda, sikka semptomlarının tek başına tedavisi, glandüler genişleme veya diğer organ tutulumu, genellikle

sekretagoglar dışında sistemik tedavi gerektirmez. Kurutma yan etkilerini ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için hastanın diğer ilaçlarında değişiklik yapılması da faydalıdır. Göz kuruluğu, ağız kuruluğu ve diğer oküler olmayan sikka semptomlarının tedavisi ayrıntılı olarak incelenecektir.

- Organ bazlı hastalık ve yapısal semptomlar – Deri döküntüleri, artrit, vaskülit ve akciğer ve böbrek belirtileri gibi ekstraplandüler belirtilere yaklaşım, SLE veya romatoid artrit (RA) için kullanılabilecek benzer. Glandüler lenfoproliferasyonun ve daha ciddi ekstraplandüler belirtilerin tedavisi genellikle glukokortikoidlerin kullanımını içerir; antimalaryaller (Hidroksiklorokin); Metotreksat, Leflunomid, Azatiyoprin, Sülfasalazin, Mikofenolik asit ve Siklosporin gibi geleneksel biyolojik olmayan hastalığı modifiye eden antiromatizmal ilaçlar (DMARD'lar); ve alkilleyici ajan Siklofosamid ve B hücrelerini hedef alan anti-CD20 antikoru Rituksimab dahil olmak üzere diğer güçlü ajanlardır [20-22].

Sjögren Hastalığında Kuru Göz Tedavisi: Genel Prensipler ve Başlangıç Tedavisi

Tüm hastalarda ilk tedavi, semptomatik rahatlama ve gözyaşı filmi homeostazının restorasyonuna odaklanmalıdır. Bu tür bir tedavi, hafif veya sadece epizodik rahatsızlığı olan hastalarda ve hafif oküler yüzey boyaması veya hafif artmış gözyaşı ozmolaritesi gibi sadece hafif lokal hastalık belirtileri olanlarda yeterli olabilir. Semptomları kötüleştirebilecek reçeteli ve reçetesiz sistemik ilaçlardan kaçınma ve oküler rahatsızlık semptomlarının giderilmesi için gerektiğinde suni gözyaşı kullanımı ilk basamakta hastaları rahatlatıcı yöntemlerdendir.

Tüm hastalık şiddeti seviyelerine sahip hastalar da dahil olmak üzere SjS hastalarının çoğunda düzenli olarak suni gözyaşı kullanılması göz kuruluğunu azaltmaya yardımcı olmaktadır. Hastalar bunları, bileşimleri, koruyucuları, ozmolariteleri ve viskoziteleri bakımından farklılık gösteren ve genellikle reçetesiz satılan mevcut birçok gözyaşı preparatı arasından seçebilirler. SjS'li hastalarda yapay gözyaşı kullanımı, SjS'li ve orta ila şiddetli göz kuruluğu olan hastaları içeren çeşitli randomize çalışmalarla desteklenmektedir [20,21]. Bu denemeler, başlangıç ölçümleriyle karşılaştırıldığında semptomatik iyileşme ve kornea epitelindeki hasarda iyileşme olduğunu gösterdi. 394 kuru göz hastasında Karboksimetilselüloz ve Hyaluronik asit içeren yapay gözyaşlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada [22] oküler semptomların, oküler yüzey lekelenmesinin ve gözyaşı parçalanma sürelerinin iyileştirilmesi açısından eşdeğer fayda elde edilmiştir.

Orta Şiddetteki Göz Kuruluğu Tedavisi

Görme işlevini düzenli olarak engelleyen epizodik veya kronik semptomları olan hastalarda, ilk koruyucu önlemlere devam edilirken genellikle ek önlemler ve topikal tedavilerde bazı değişiklikler gerekebilir.

Koruyucu içermeyen suni gözyaşı damlalarının düzenli kullanımına ek olarak bu hastalar için geceleri kayganlaştırıcı bir merhem kullanılmaktadır. Geceleri suni gözyaşı ve merhem ile rahatlama yetersizse, gündüz jel formülasyonu denenebilmektedir. Hastaların her damla uygulamasının mevcut gözyaşı filminin homeostazını bozabilme ihtimaline karşı "mümkün olduğunca sık" suni gözyaşı kullanmaktan kaçınılmalıdır [23]. Topikal steroidlerle birlikte veya tek başına topikal Siklosporin ya da Lifitegrast kullanmak için, bu ilaçların reçetesi göz hekimi tarafından yazılmalıdır. Göz içi basıncının düzenli olarak izlenmesi gereklidir, çünkü uzun süreli steroid kullanımı katarakt ve glokom gibi komplikasyonlara yol açabilir. Bu nedenle, topikal steroidlerin sadece kısa süreli kullanımı önerilir.

Topikal Antiinflamatuvar / İmmünomodülatör Ajanlar

Sadece suni gözyaşı ve kayganlaştırıcıların düzenli kullanımına rağmen kalıcı semptomları veya kuru göz hastalığı belirtileri olan hastalarda Siklosporin veya Lifitegrast gibi topikal bir antiinflamatuvar/immünomodülatör ajan kullanılmaktadır. Uzun güvenlik ve etkinlik geçmişi göz önüne alındığında, ilk seçenek olarak topikal Siklosporin önerilmektedir ve kalıcı semptomları veya belirtileri olan hastalarda doz artışını düşünmeden önce üç aylık bir süre boyunca günde iki kez başlangıç dozunda Siklosporin kullanılmaktadır. Semptomların devam ettiği veya orta derecede şiddetli kornea lekelenmesi olan veya damlatılmasından aşırı rahatsızlık duyan topikal Siklosporin hastalarında topikal Lifitegrasta geçilmektedir. Topikal Lifitegrast topikal Siklosporine göre daha hızlı semptom gidermekte ve daha az

oküler tahriş oluşturmaktadır. Bununla birlikte, uzun süreli etkinlik ve güvenlik sadece topikal Siklosporin için belirlenmiştir. Lifitegrast, FDA tarafından 18 yaşın altındaki bireyler için onaylanmamıştır. Bu iki ilacın birlikte kullanımını araştırılmamıştır ve bu nedenle tavsiye edilmemektedir [24].

Topikal Siklosporin

Topikal Siklosporin sistemik olarak uygulandığında immünosupresif bir ajandır. Sikka ile ilişkili oküler enflamasyona bağlı olarak gözyaşı yapımının baskılandığı öngörülen hastalarda, Siklosporin emülsiyonunun parsiyel bir immünomodülatör olarak etkilediği düşünülmektedir. Kesin etki mekanizması bilinmemektedir. Topikal Siklosporin (%0.05 oftalmik emülsiyon veya %0.09 nanomisel formülasyonu) günde iki kez bir damla olarak uygulanır ve suni gözyaşları ile birlikte kullanılabilir. Aktif oküler enfeksiyonu olan hastalarda kullanım kontrendikedir. Yanıtlar bazı hastalarda iki ila üç ay ve bazen bir yıla kadar sürebilmektedir. Buna göre, kalıcı semptomları veya belirtileri olan hastaları, bir tedavi başarısızlığı olarak kabul etmeden önce tipik olarak bir yıl boyunca günde dört defaya kadar dozlarda topikal Siklosporin ile tedavi tercih etmektedirler [25,26].

İntranazal Sekretagog

Vareniklin, kuru göz hastalığının tedavisi için FDA tarafından onaylanmış kolinerjik bir agonisttir. Yapılan bir çalışmada, Vareniklin ile tedavi edilen kuru göz hastalığı olan hastalarda gözyaşı üretiminde 10 mm veya daha fazla artış, tek başına araca göre daha sık görülmüştür. Hapşırma, öksürük, boğaz tahrişi ve damlatma bölgesi tahrişi en sık görülen yan etkilerdir. Bu intranazal ilaç tedavisi henüz kuru göz hastalığı için oftalmik tedavilerle karşılaştırılmamıştır [27].

Araştırma Ajanları

Yerleşik immünosüpresif veya immünomodülatör ajanlara ek olarak, potansiyel yarar gösteren bazı kanıtların bulunduğu daha fazla çalışma gerektiren başka tedaviler de vardır.

Lakritin, gözyaşı bezlerinin asiner hücreleri tarafından salgılanan bir gözyaşı proteindir. Bu proteinin bir formülasyonu, SjS nedeniyle kuru göz hastalarında test edilmektedir [28].

Timozin beta-4, insan dokularında doğal olarak oluşan, yara iyileştirici ve antiinflamatuvar özelliklere sahip bir peptit olup, 9 denekten oluşan randomize bir faz II denemesinde şiddetli kuru göz hastalığının topikal tedavisi olarak değerlendirilmiştir. Hem belirti hem de semptomlarda iyileşme gözlenmiştir [29].

Sjögren Hastalığında Ağız Kuruluğu ve Diğer Oküler Olmayan Sikka Semptomlarının Tedavisi

Tükürük bezi hipofonksiyonuna bağlı ağız kuruluğunun tedavisi, semptomları hafifletmeyi ve diş çürüğü, diş eti iltihabı, ağız kokusu, tükürük bezi taşı, yutma güçlüğü ve oral kandidiyazis gibi komplikasyonları önlemeyi amaçlamaktadır. Normal tükürük fonksiyonlarının kaybını telafi etmek için çeşitli stratejiler kullanılır; bu işlevler arasında mukozanın yağlanması, diş plağına ve bakteri üremesine yol açabilecek yiyecek artıklarının temizlenmesine yardımcı olunması, dişlerin demineralizasyonunu destekleyen asitlerin tamponlanması ve antimikrobiyal etkilerin sağlanması yer almaktadır. Bu nedenle, rezidüel tükürük akışını uyarmak, mantar enfeksiyonunu tedavi etmek, diş bakımına yakından dikkat etmek tedavinin ana amaçlarındandır [30].

Ağız kuruluğu olan hastalarda genel tedavi yaklaşımı şu şekildedir; tükürük ikameleri, Pilokarpin ve Sevimelelin dahil olmak üzere muskarinik agonistler, Hidroksiklorokin ve Rituksimab gibi sistemik antiinflamatuvar ve immünosüpresif ilaçlar yarar sağlamaktadır [31].

Tükürük Stimülasyonuna ve İkamelerine Yetersiz Yanıt

Topikal uyarıcılar veya tükürük ikamesi ile yeterli tükürük salgısı veya semptomatik rahatlama sağlayamayan tükürük hipofonksiyonu ve kserostomi hastalarında Pilokarpin veya Sevimelelin gibi bir muskarinik agonistin kullanılması önerilmektedir. Bu muskarinik agonistler tükürük akışının artmasını ve plaseboya kıyasla ağız kuruluğu semptomlarının iyileşmesine katkı sağlamaktadır. Plaseboya kıyasla eşit derecede etkili görülen Pilokarpin ve Sevimelelin arasındaki seçim, büyük ölçüde bireysel faktörler

tarafından belirlenmektedir; Bunlar, hastaya maliyeti, bireysel klinik yanıtı, rahatlığı ve ilaç bulunabilirliğine ilişkin düzenleyici veya sigorta sınırlamalarını içermektedir.

Bunların dışında aşağıdaki faktörler ilaçları farklılaştırılabilir;

- Pilokarpinden daha uzun bir yarı ömre sahip olan Sevimelin, bazı hastalar tarafından daha iyi tolere edilir ve genellikle günde üç kez doz yeterlidir.
- Sevimelin, Pilokarpinden daha az terleme veya kızarıklık yapar ancak gastrointestinal yan etkilere daha sık neden olur [32].
- Genellikle günde dört kez dozlanan Pilokarpin kullanan hastalar, bu ilacın nispeten kısa serum yarılanma ömrü nedeniyle tipik olarak kısa bir tükürük atağı yaşarlar [33].
- Bazı formüllerler, Sevimelin kullanımını onaylamadan önce, daha uzun süre mevcut olan Pilokarpinin ilk denemesini gerektirir ve Pilokarpine yanıt vermeyen veya tolere etmeyen hastalar, daha önce Pilokarpin ile tedavi edilen hastalar da dahil olmak üzere Sevimelin'den yararlanabilmektedir.

Pilokarpin Etkinliği

Tüm muskarinik reseptörleri (M1, M2 ve M3) uyarıcı bir muskarinik agonist olan Pilokarpin, artık tükürük bezi fonksiyonu olan hastalarda sulu sekresyonları artırabilmektedir. Kserostomi üzerindeki etkilere ek olarak, pilokarpin, gözyaşı üretiminde herhangi bir objektif değişiklik olmamasına rağmen, oküler kuruluk semptomlarını iyileştirebilmektedir. Burun, vajinal ve cilt kuruluğu semptomlarında da iyileşme göstermiştir [34].

Sevimelin Etkinliği

Sevimelin, lakrimal ve tükürük epitelindeki muskarinik M1 ve M3 reseptörleri için kalp dokusundaki reseptörlere göre daha yüksek afiniteye sahip bir asetilkolin türevidir. Sevimelin'in etkinliği, birincil veya ikincil Sjs'li 197 hastayı rastgele Sevimelin veya plaseboya atayan bir çalışmada gösterilmiştir [35].

Bu ilaçların (Pilokarpin ve Sevimelin) kullanımı, aşırı terleme, artmış idrar sıklığı, kızarıklık, titreme, rinit, bulantı ve ishal gibi kolinerjik yan etkiler nedeniyle zayıf tolerans ile sınırlandırılabilir. Kontrolsüz astım ve obstrüktif akciğer hastalığı olan hastalarda kontrendikedir. Her iki ilacın da diğer seyrek yan etkileri arasında bradikardi ve hipotansiyon bulunur. Bu nedenle kardiyovasküler hastalığı olan hastalarda ve beta bloker kullananlarda dikkatli kullanılmalıdır. Bu ilaçları kullanan hastalar, görme keskinliğinin azalmasının ve bozulmuş derinlik algısının çok nadir görülen olumsuz etkileri nedeniyle gece araba kullanma veya düşük ışıkta tehlikeli faaliyetlerde bulunma konusunda uyarılmalıdır [36,37].

Diğer Sikka Semptomlarının Tedavisi

Hastalar ayrıca kuru göz ve ağız kuruluğuna ek olarak burun kuruluğu, laringotrakeal ve genitoüriner semptomlar ve kuru cilt problemlerinin de iyileştirilmesi hastaların hayatlarını kolaylaştırması açısından önemlidir. Bu problemler, Sjögren hastalığı olan hastalarda yapılan randomize çalışmaların veya diğer çalışmaların odak noktası olmamıştır ve bunların yönetimi büyük ölçüde Sjs olmayan hastaların tedavisine ve klinik deneyime dayanmaktadır. Bu belirtilere sahip hastalar, Pilokarpin veya Sevimelin gibi muskarinik agonistlerin kullanımından da yararlanabilmektedir. Ağız kuruluğu ve kuru göz için randomize Pilokarpin çalışması [34], ilacın burun, cilt ve vajinal kuruluk semptomları için plasebodan daha etkili olabileceğini düşündürmüştür.

Organ Temelli Hastalık ve Yapısal Semptomlar İçin Tedavi

Kas ve İskelet Ağrısı

Kas-iskelet ağrısının tedavisi, semptomların nedenine, ciddiyetine ve tedaviye verilen cevaba göre değişiklik gösterebilmektedir; Sjs'de inflamatuvar kas-iskelet ağrısı spektrumu hafif artralji ve miyaljilerden açık sinovit ve kronik ağrıya kadar değişebilmektedir. Ek olarak, yaşa bağlı osteoartrit ve fibromiyalji de Sjs hastalarında kas-iskelet sistemi ağrılarının şiddetini artırabilmektedir.

Artralji ve Artrit

Hafif artritli olanlar ve artralji ve miyaljisi olan ancak kesin inflamatuvar sinoviti olmayanlar da dahil olmak üzere hafif eklem semptomları olan hastalar, semptom sıklığına bağlı olarak günlük olarak veya ihtiyaç duyulduğunda verilen antiinflamatuvar dozlarda steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID'ler) ile tedavi edilebilmektedir. Bir ila iki aylık bir denemeden sonra NSAID'lere yetersiz yanıt veren veya orta ila şiddetli semptomları olan hastalar, hastalığın ciddiyetine bağlı olarak genellikle Hidroksiklorokin veya düşük doz haftalık Metotreksat gibi geleneksel biyolojik olmayan, DMARD ile tedavi sürdürülmektedir. Tedaviye dirençli hastalarda özellikle de RA'nın örtüşen özelliklerine sahip SjS hastaları, bazen Rituksimab veya bir tümör nekroz faktörü (TNF) alfa inhibitörü ile biyolojik tedavi ile semptomları kontrol altına alınabilmektedir [37].

Yorgunluk

Diğer bağ dokusu hastalığı hastalarında görüldüğü gibi, yorgunluk SjS'de sıklıkla görülür ve bazen şiddetli olabilmektedir. Genellikle çok faktörlüdür ve yorgunluğun diğer ilişkili veya tesadüfi nedenleri hasta semptomlarına katkı sağlayabilmektedir. Bu nedenle, yönetime ilk yaklaşım, bireysel hastada yorgunluğun etiyolojisini veya etiyolojilerini belirlemek için kapsamlı bir değerlendirme gerekmektedir. Büyük ölçüde SjS'nin kendisiyle ilişkili yorgunluğu olan hastalarda, tüm hastalar için birinci basamak tedavi olarak düşük etkili bir aerobik egzersiz programları yorgunluğun giderilmesine katkı sağlayabilmektedir. Egzersize ve diğer yaşam tarzı değişikliklerine dirençli yorgunluğu olan hastalarda, Hidroksiklorokin SLE için kullanılan yaklaşıma benzer bir şekilde kullanılmaktadır [37].

Spesifik Terapötik Ajanların Etkinliği

Glukokortikoidler

Glukokortikoidlerin SjS'nin glandüler belirtileri için potansiyel faydasını ele alan büyük bir çalışma yapılmamıştır. SjS'de glukokortikoidlerin uzun süreli kullanımı, romatoid artrit (RA) ve diğer hastalıklarda olduğu gibi osteoporoz, hiperglisemi, kilo alımı, ajitasyon ve artmış enfeksiyon riski dahil olmak üzere potansiyel yan etkilere ilişkin endişelere de iyi gelmektedir. SjS hastalarında, oral kandidiyazis riskinin artması ve diş çürümesinin hızlanması, glukokortikoidlerin daha yüksek dozda uzun süreli kullanımını daha da sınırlamaktadır. Glukokortikoidler bazen SjS'nin sistemik belirtilerini diğer sistemik romatizmal ve otoimmün hastalıklara benzer bir şekilde tedavi etmek için de tercih edilmektedir. Primer SjS'li 1120 İspanyol hastanın analizinde, bu tür hastaların % 19'unda bu amaçla düşük doz glukokortikoidler (Prednizon ≤ 20 mg/gün) eşdeğer kullanılmıştır [38].

Kronik hastalıkta kullanılan glukokortikoidler olan Prednizon veya Prednizolon önemli mineralokortikoid, androjenik veya östrojenik aktiviteye sahip değildir; bu nedenle, başlıca yan etkileri hipotalamik-hipofiz-adrenal fonksiyonun inhibisyonundan ve iyatrojenik Cushing sendromunun gelişmesinden kaynaklanır. Glukokortikoid biyoyararlanımı ve reseptör aktivasyonundaki farklılıklar, farklı glukokortikoidlerin etkinliğini ve toksisitesini etkilemektedir. Bu nedenle, glukokortikoid reseptörü ve glukokortikoid metabolizmasındaki genetik polimorfizmler, glukokortikoid etkilerini değiştirebilmektedir. Bu değişkenlik, hastalar arasında tedaviye ve toksisitelere karşı gösterdikleri farklı direnci açıklamaktadır. Ön hipofiz ve adrenal bezdeki hücrelerin atrofisi gibi glukokortikoid maruziyetinin uzun süreli etkileri, kısmen glukokortikoidlerin hücre fonksiyon üzerindeki spesifik olmayan etkilerinden kaynaklanmaktadır. Hücre atrofisi meydana geldiğinde, glukokortikoid etkilerinden tam iyileşme, ilacı durdurduktan sonra aylar hatta yıllar alabilmektedir. Glukokortikoidler Hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen supresyonuna neden olabilmektedir. Eksojen glukokortikoidlerin uygulanması, özellikle bölünmüş dozlarda verildiğinde, HPA eksenini baskılayabilmektedir. Bu tür hastalarda glukokortikoidlerin aniden kesilmesi veya hızlı bir şekilde kesilmesi adrenal yetmezlik semptomlarına yol açabilmektedir. Glukokortikoidlerin hiperglisemiye neden olduğu mekanizma, hepatik glukoneogenezin artırılması, yağ dokusunda glikoz alımının inhibisyonu ve reseptör ve reseptör sonrası fonksiyonların değiştirilmesi dahil olmak üzere birçok faktöre bağlıdır. RA gibi glukokortikoidlerin kullanıldığı bazı altta yatan bozuklukların bağımsız olarak daha yüksek bir glikoz intoleransı oranına yatkın olmasından kaynaklı olabilmektedir [39].

Konvansiyonel İmmünsüpresif İlaçlar ve Biyolojik Olmayan DMARD'lar

Hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlar (DMARD'lar) öncelikle spesifik organ bulgularını tedavi etmek için kullanılır.

Metotreksat

Metotreksat, folik asit antimetaboliti olarak etki gösteren antineoplastik bir ilaçtır. Metotreksat reversibl olarak dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek folik asidin tetrafolik aside dönüşümünü engeller. Tetrafolat enziminin inhibe edilmesi ile DNA, RNA ve ATP sentezi için gerekli purin bazlarının sentezinin durmasına yol açar ve protein sentezini inhibe eder. Böylece DNA sentezi ve hücre yenilenmesinde gerekli olan deoksiürdilatin timidilata dönüşümü sınırlıdır. Metotreksat S dönemindeki hücrelere daha etkilidir. Primer SjS'li 17 hastada Metotreksat (haftalık 0.2 mg / kg) ile ilgili bir yıllık pilot çalışma, ağız kuruluğu ve göz semptomlarında, artraljilerde, artrit ve parotis bezi genişlemesi ve purpura sıklığında iyileşme gösterdi. Bununla birlikte, kuru gözlerin ve ağız kuruluğunun objektif parametrelerinde herhangi bir iyileşme gözlenmemiştir [40].

Azatioprin

Etki mekanizması henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamış olmakla birlikte, önerilen bazı mekanizmalar şunlardır; purin antimetaboliti işlevi gören merkaptopürinin açığa çıkarılması, SH gruplarının alkilasyonu ile olası blokaj, nükleik asit biyosentezinde pek çok yolun inhibe edilmesi ve böylece immün cevabın verilmesi ve şiddetlenmesi ile ilgili hücrelerin proliferasyonunun önlenmesi, purin tioanalogların dahil edilmesi ile DNAnın zarar görmesidir.

Primer SjS'li 25 hastada düşük doz Azatioprin randomize bir çalışmada, altı aylık bir süre boyunca hastalık aktivitesinde önemli bir değişiklik olmamıştır [41]. Bununla birlikte, daha yüksek dozlarda Azatioprin, interstisyel pnömoni, miyelopati ve kronik aktif otoimmün hepatit gibi spesifik ekstraplandüler tutulumların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Leflunomid

Leflunomid, dihidroorotat dehidrojenazı inhibe ederek çalışan bir pirimidin sentez inhibitörüdür ve antiproliferatif etki gösterir.

Açık etiketli bir pilot çalışmada, Leflunomid (20 mg/gün), erken ve aktif primer SjD'li 15 hasta için düşük derecede fayda görüldüğü bildirilmiştir [42]. Bununla birlikte, 3 hastada lökositoklastik vaskülitte kayda değer bir iyileşme gözlenmiştir. Tedavi, 5 hastada lupus benzeri cilt lezyonlarının gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. Leflunomid (20 mg/gün) ve Hidroksiklorokin (400 mg/gün) ile küçük, kontrollü, randomize 24 haftalık bir kombinasyon tedavisi çalışması, 29 hastayı içeren bir çalışmada tek başına plasebo ile karşılaştırıldığında, önemli klinik etkinlik göstermiştir. Bu sonuçların daha büyük bir çalışmada doğrulanması gereklidir [43].

Siklosporin

Siklosporin, T hücrelerinin interlökin-2 yapımını bloke eden bir kalsinörin inhibitörüdür. Siklosporinin lenfokin sentezini azaltarak T hücre aktivasyonu engellediğine ve dolaylı yoldan keratinosit proliferasyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir. Siklosporin lipofilik bir molekül olup konvansiyonel biçimde hazırlanmış oral preparatların emilimi son derece azdır. Hidrofilik özelliği artırılmış mikroemülsiyonların emilimi ve biyoyararlanımı çok daha yüksektir. Randomize bir çalışmada, Siklosporin (5 mg/kg/gün), plaseboya kıyasla altı ayda ağız kuruluğunda semptomatik iyileşme ile sonuçlanmıştır, ancak kuru göz semptomlarında veya oküler ve oral kuruluğun objektif parametrelerinde değişiklik olmadığı görülmüştür [44].

Siklosporin, organ nakillerinde ve bazı otoimmün hastalıklarda kullanılan güçlü bir immünosüpresandır. Ancak, kullanımı bir dizi yan etki riski taşır. Yaygın yan etkiler arasında yüksek kan basıncı, böbrek fonksiyonlarında bozulma, tremor bulunmaktadır.

Ritüksimab

Ritüksimab, bağışıklık sistemi hücrelerinin yüzeylerindeki CD20 adı verilen antijene karşı bir monoklonal antikordur.

Primer SjS’de Ritüksimabın Toleransı ve Etkinliği (TEARS) çalışması, kuruluk ve yorgunluk için plaseboya karşı Ritüksimabın 24 haftalık çok merkezli bir denemesi olup 120 SjS hastasında yapılmıştır [45]. Hastalık aktivitesi, yorgunluk ve kurulukta 6. ve/veya 16. haftalarda bazı semptomatik iyileşme gösterdiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, çalışma, küresel hastalık, ağrı, yorgunluk ve kuruluk için dört görsel analog ölçeğin ikisinde en az 30 mm iyileşme olarak tanımlanan, altı ayda birincil çalışma son noktasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir [46].

Yan etkileri arasında alerjik reaksiyonlar, ciddi cilt reaksiyonları, enfeksiyon riski artışı, konfüzyon, hafıza sorunları, deri ve ağız sorunları, şiddetli mide ağrısı, düzensiz kalp atışları, sarılık, enfeksiyon belirtileri ve tümör hücresi yıkımı sendromu bulunmaktadır.

SjS tedavisinde kullanılan ilaçlar Tablo 1’de listelenmiştir.

Tablo 1. SjS tedavisinde kullanılan ilaçlar

Semptomlar/İlaç Grupları	İlaçlar
Orta şiddetteki göz kuruluğu tedavisi	• Siklosporin
	• Vareniklin
	• Lifitegrast
Ağız kuruluğu ve diğer oküler olmayan sikka semptomlarının tedavisi	• Pilokarpin
	• Sevimeilin
Organ temelli hastalık ve yapısal semptomlar için tedavi	• NSAID*
	• DMARD**
	• Ritüksimab
	• TNF alfa inhibitörü***
	• Hidroksiklorokin
Spesifik terapötik ajanlar	• Prednizon
	• Prednizolon
Konvansiyonel immünsüpresif ilaçlar ve biyolojik olmayan DMARD'lar	• Metotreksat
	• Azatioprin
	• Leflunomid
	• Siklosporin
	• Ritüksimab

*NSAID: Non-steroidal antiinflatuar ilaçlar

**DMARD: Hastalığı modifiye eden antiromatizmal ilaçlar

***TNF alfa inhibitörü: Tümör nekroz faktörü alfa inhibitörü

SONUÇ VE TARTIŞMA

SjS sendromu, vücudun tükürük bezleri, gözyaşı bezleri ve diğer salgı bezlerini etkileyen kronik bir otoimmün hastalıktır. Bu sendromda, vücudun bağışıklık sistemi kendi dokularına saldırarak, tükürük ve gözyaşı gibi salgı bezlerini tahrip etmektedir. Sonuç olarak, hastalarda ağız kuruluğu, göz kuruluğu, ağız ve burun mukozasında kuruluk, ciltte kuruluk gibi semptomlar görülür. Ayrıca, eklem ağrıları, yorgunluk, kas ve sinir sistemi problemleri gibi sistemik belirtiler de ortaya çıkabilir. SjS’nin değerlendirilmesi ve yönetimi, genellikle bir romatolog, bir göz sağlığı uzmanı ve bir diş hekimi veya ağız tıbbi uzmanından oluşan multidisipliner bir ekip tarafından sağlanmaktadır. Hastalar, tanıyı doğrulamak ve öykü, fizik muayene, laboratuvar testleri ve histopatolojik bulgulara dayanarak hastalığın ve hastalık alt kümesinin şiddetini ve derecesini belirlemek için kapsamlı bir tedavi öncesi değerlendirmeye tabi tutulmalıdır. Yönetime yaklaşım genellikle birincil veya ikincil SjS için aynıdır. Tüm hastalar, terapötik yaşam tarzı değişiklikleri ve farmakolojik ajanlardan yararlanmalıdır.

Glandüler genişleme veya diğer organ tutulumu olmadan tek başına sikka semptomları olanları içeren hafif SjS’li hastalarda, tedavi genellikle oküler, oral ve diğer kuruluk semptomları için lokal

tedaviye ek olarak sekretagoglar dışında sistemik tedavi gerektirmez, durumun izlenmesi ve olağan tıbbi ve dış koruyucu bakım uygulanmalıdır. Orta ve şiddetli tutulumu olan hastalar genellikle klinik tabloya, dokulara ve etkilenen organ sistemine bağlı olarak immünsüpresiflerin ve biyolojik ajanların kullanımı da dahil olmak üzere sistemik tıbbi tedaviye ihtiyaç duyarlar. Tedavi, diğer sistemik romatizmal hastalıklara, özellikle SLE ve RA yaklaşımına benzemektedir.

YAZAR KATKILARI

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

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Ramos-casals, M., Brito-zerón, P., Sisó-almirall, A., Bosch, X., Tzioufas, A.G. (2012). Topical and systemic medications for the treatment of primary Sjögren's syndrome. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(7), 399-411. [\[CrossRef\]](#)
2. Manoussakis, M.N., Georgopoulou, C., Zintzaras, E., Spyropoulou, M., Stavropoulou, A., Skopouli, F.N., Moutsopoulos, H.M. (2004). Sjögren's syndrome associated with systemic lupus erythematosus: Clinical and laboratory profiles and comparison with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis & Rheumatism*, 50, 882-891. [\[CrossRef\]](#)
3. Seror, R., Theander, E., Brun, J.G., Ramos-Casals, M., Valim, V., Dörner, T., Bowman, S.J. (2015). Validation of EULAR primary Sjögren's syndrome disease activity (ESSDAI) and patient indexes (ESSPRI). *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74, 859-866.
4. Qin, B., Wang, J., Yang, Z., Yang, M., Ma, N., Huang, F., Zhong, R. (2015). Epidemiology of primary sjögren's syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74, 1983-1989. [\[CrossRef\]](#)
5. Kvarnstrom, M., Ottosson, V., Nordmark, B., Wahren-herlenius, M. (2015). Incident cases of primary sjögren's syndrome during a 5-year period in stockholm county: A descriptive study of the patients and their characteristics. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 44, 135-142. [\[CrossRef\]](#)
6. Weng, M.Y., Huang, Y.T., Liu, M.F., Lu, T.H. (2011). Incidence and mortality of treated primary Sjögren's syndrome in taiwan: A population-based study. *Journal of Rheumatology*, 38, 706-708. [\[CrossRef\]](#)
7. Baer, A.N., Maynard, J.W., Shaikh, F., Magder, L.S., Petri, M. (2010). Secondary Sjögren's syndrome in systemic lupus erythematosus defines a distinct disease subset. *Journal of Rheumatology*, 37, 1143-1149. [\[CrossRef\]](#)
8. Carmona, L., González-álvaro, I., Balsa, A., Belmonte, M.A., Tena, X., Sanmartí, R., Gomez-reino, J.J. (2003). Rheumatoid arthritis in Spain: Occurrence of extra-articular manifestations and estimates of disease severity. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62, 897-900. [\[CrossRef\]](#)
9. Avouac, J., Airò, P., Dieude, P., Caramaschi, P., Tiev, K., Diot, E., Matucci-cerinic, M. (2010). Associated autoimmune diseases in systemic sclerosis define a subset of patients with milder disease: Results from 2 large cohorts of European Caucasian patients. *Journal of Rheumatology*, 37, 608-614. [\[CrossRef\]](#)
10. Tzioufas, A.G., Kapsogeorgou, E.K., Moutsopoulos, H.M. (2012). Pathogenesis of Sjögren's syndrome: What we know and what we should learn. *Journal of Autoimmunity*, 39, 4-8. [\[CrossRef\]](#)
11. Hillen, M.R., Ververs, F.A., Kruize, A.A., Van roon, J.A. (2014). Dendritic cells, t-cells and epithelial cells: A crucial interplay in immunopathology of primary Sjögren's syndrome. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10, 521-531. [\[CrossRef\]](#)
12. Albrecht, J., Berlin, J.A., Braverman, I.M., Chrousos, G.P., Garrido, M.C., Marques, G. (2006). Skin involvement and outcome measures in systemic autoimmune diseases. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 24(41), 52-59.
13. Ramos-casals, M., Brito-zerón, P., Seror, R., Bootsma, H., Bowman, S.J., Dörner, T., Tzioufas, A. (2015). Characterization of systemic disease in primary Sjögren's syndrome: EULAR-SS task force recommendations for articular, cutaneous, pulmonary and renal involvements. *Rheumatology*. [\[CrossRef\]](#)

14. Zero, D.T., Brennan, M.T., Daniels, T.E., Papas, A., Stewart, C., Pinto, A., Hammitt, K.M (2016). Clinical practice guidelines for oral management of Sjögren disease: Dental caries prevention. *The Journal of the American Dental Association (JADA)*, 147, 295-305. [\[CrossRef\]](#)
15. Gottenberg, J.E., Ravaud, P., Puéchal, X., Le guern, V., Sibilia, J., Goeb, V., Mariette, X. (2014). Effects of hydroxychloroquine on symptomatic improvement in primary Sjögren syndrome. *Jama*, 312(3), 249. [\[CrossRef\]](#)
16. Steinfeld, S.D., Tant, L., Burmester, G.R., Teoh, N.K., Wegener, W.A., Goldenberg, D.M., Pradier, O. (2006). Epratuzumab (humanised anti-cd22 antibody) in primary Sjögren's syndrome: An open-label phase I/II study. *Arthritis Research & Therapy*, 8, 1-11. [\[CrossRef\]](#)
17. Adler, S., Körner, M., Förger, F., Huscher, D., Caversaccio, M.D., Villiger, P.M. (2013). Evaluation of histological, serological and clinical changes in response to abatacept treatment of primary Sjögren's syndrome: A pilot study. *Arthritis Care & Research*, 65(11), 1862-1868. [\[CrossRef\]](#)
18. Rummel, M.J., Niederle, N., Maschmeyer, G., Banat, G.A., von Grünhagen, U., Losem, C., Brugger, W. (2013). Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: An open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet*, 381, 1203-1210. [\[CrossRef\]](#)
19. Voulgarelis, M., Giannouli, S., Tzioufas, A.G., Moutsopoulos, H.M. (2006). Long term remission of sjögren's syndrome associated aggressive B cell non-hodgkin's lymphomas following combined B cell depletion therapy and CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone). *Annals of the Rheumatic Diseases*, 65(8), 1033-1037. [\[CrossRef\]](#)
20. Aragona, P. (2002). Sodium hyaluronate eye drops of different osmolarity for the treatment of dry eye in Sjogren's syndrome patients. *British Journal of Ophthalmology*, 86(8), 879-884. [\[CrossRef\]](#)
21. Mcdonald, C.C., Kaye, S.B., Figueiredo, F.C., Macintosh, G., Lockett, C. (2002). A randomised, crossover, multicentre study to compare the performance of 0.1% (w/v) sodium hyaluronate with 1.4% (w/v) polyvinyl alcohol in the alleviation of symptoms associated with dry eye syndrome. *Eye*, 16(5), 601-607. [\[CrossRef\]](#)
22. Aragona, P., Benítez-del-castillo, J.M., Coroneo, M.T., Mukherji, S., Tan, J., Vandewalle, E., Simmons, P.A. (2020). Safety and efficacy of a preservative-free artificial tear containing carboxymethylcellulose and hyaluronic acid for dry eye disease: A randomized, controlled, multicenter 3-month study. *Clinical Ophthalmology*, volume 14, 2951-2963. [\[CrossRef\]](#)
23. Sullivan, D.A., Dana, R., Sullivan, R.M., Krenzer, K.L., Sahin, A., Arica, B., Cermak, J.M. (2018). Meibomian gland dysfunction in primary and secondary Sjögren syndrome. *Ophthalmic Research*, 59(4), 193-205. [\[CrossRef\]](#)
24. Holland, E.J., Luchs, J., Karpecki, P.M., Nichols, K.K., Jackson, M.A., Sall, K., Tauber, J., Roy, M., Raychaudhuri, A., Shojaei, A. (2017). Lifitegrast for the treatment of dry eye disease: Results of a phase III, randomized, double-masked, placebo-controlled trial (OPUS-3). *Ophthalmology*, 124(1), 53-60. [\[CrossRef\]](#)
25. Foulks, G.N. (2008). Treatment of dry eye disease by the non-ophthalmologist. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 34(4), 987-1000. [\[CrossRef\]](#)
26. Sall, K., Stevenson, O.D., Mundorf, T.K., Reis, B.L. (2000). Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. *Reprint requests to: Linda Lewis, 575 Anton Blvd, Suite 900, Costa Mesa, CA 92626. Ophthalmology*, 107(4), 631-639. [\[CrossRef\]](#)
27. Hauswirth, S.G., Kabat, A.G., Hemphill, M., Somaiya, K., Hendrix, L.H., Gibson, A.A. (2023). Safety, adherence and discontinuation in varenicline solution nasal spray clinical trials for dry eye disease. *Journal of Comparative Effectiveness Research*, (12), (6). [\[CrossRef\]](#)
28. Vijmasi, T., Chen, F.Y.T., Balasubbu, S., Gallup, M., Mckown, R.L., Laurie, G.W., Mcnamara, N.A. (2014). Topical administration of lacritin is a novel therapy for aqueous-deficient dry eye disease. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55(8), 5401. [\[CrossRef\]](#)
29. Sosne, G., Dunn, S.P., Kim, C. (2015). Thymosin β 4 significantly improves signs and symptoms of severe dry eye in a phase 2 randomized trial. *Cornea*, 34(5), 491-496. [\[CrossRef\]](#)
30. Wu, A.J. (2008). Optimizing dry mouth treatment for individuals with Sjögren's syndrome. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 34(4), 1001-1010. [\[CrossRef\]](#)
31. Salum, F.G., Medella-junior, F. De A.C., Figueiredo, M.A.Z., Cherubini, K. (2018). Salivary hypofunction: An update on therapeutic strategies. *Gerodontology*. [\[CrossRef\]](#)
32. Papas, A.S., Sherrer, Y.S., Charney, M., Golden, H.E., Medsger, T.A., Walsh, B.T., Gallagher, S.C. (2004). Successful treatment of dry mouth and dry eye symptoms in Sjögren's syndrome patients with oral pilocarpine: A randomized, placebo-controlled, dose-adjustment study. *JCR: Journal of Clinical Rheumatology*, 10(4), 169-177. [\[CrossRef\]](#)

33. Fife, R.S., Chase, W.F., Dore, R.K., Wiesenhutter, C.W., Lockhart, P.B., Tindall, E., Suen, J.Y. (2002). Sevimelein for the treatment of xerostomia in patients with Sjögren syndrome. *Archives of Internal Medicine*, 162(11), 1293. [\[CrossRef\]](#)
34. Tsifetaki, N. (2003). Oral pilocarpine for the treatment of ocular symptoms in patients with Sjogren's syndrome: A randomised 12 week controlled study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62(12), 1204-1207. [\[CrossRef\]](#)
35. Petrone, D., Condemi, J.J., Fife, R., Gluck, O., Cohen, S., Dalgin, P. (2002). A double-blind, randomized, placebo-controlled study of Sevimelein in Sjögren's syndrome patients with xerostomia and keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis and Rheumatism*, 46(3), 748-754. [\[CrossRef\]](#)
36. Hendrickson, R.G., Morocco, A.P., Greenberg, M.I. (2004). Pilocarpine toxicity and the treatment of xerostomia. *The Journal of Emergency Medicine*, 26(4), 429-432. [\[CrossRef\]](#)
37. Carsons, S.E., Vivino, F.B., Parke, A., Carteron, N., Sankar, V., Brasington, R., Mandel, S. (2017). Treatment guidelines for rheumatologic manifestations of Sjögren's syndrome: Use of biologic agents, management of fatigue, and inflammatory musculoskeletal pain. *Arthritis Care and Research*, 69(4), 517-527. [\[CrossRef\]](#)
38. Gheitasi, H., Kostov, B., Solans, R., Fraile, G., Suárez-Cuervo, C., Casanovas, A., Brito-zerón, P. (2015). How are we treating our systemic patients with primary Sjögren syndrome? Analysis of 1120 patients. *International Immunopharmacology*, 27(2), 194-199. [\[CrossRef\]](#)
39. Hoes, J.N., Van der goes, M.C., Van raalte, D.H., Van der Zijl, N.J., Den Uyl, D., Lems, W.F., Bijlsma, J.W.J. (2011). Glucose tolerance, insulin sensitivity and β -cell function in patients with rheumatoid arthritis treated with or without low-to-medium dose glucocorticoids. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(11), 1887-1894. [\[CrossRef\]](#)
40. Skopouli, F.N., Jagiello, P., Tsifetaki, N., Moutsopoulos, H.M. (1996). Methotrexate in primary Sjögren's syndrome. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 14(5), 555-558.
41. Price, E.J., Rigby, S.P., Clancy, U., Venables, P.J. (1998). A double-blind placebo-controlled trial of azathioprine in the treatment of primary Sjögren's syndrome. *Journal of Rheumatology*, 25(5), 896.
42. Van Woerkom, J.M., Kruize, A.A., Geenen, R., Van Roon, E.N., Goldschmeding, R., Verstappen, S.M. M., Bijlsma, J.W.J. (2007). Safety and efficacy of leflunomide in primary sjogren's syndrome: A phase II pilot study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 66(8), 1026-1032. [\[CrossRef\]](#)
43. Van der Heijden, E.H.M., Blokland, S.L.M., Hillen, M.R., Lopes, A.P.P., van Vliet-Moret, F.M., Rosenberg, A.J.W.P., van Roon, J.A.G. (2020). Leflunomide-hydroxychloroquine combination therapy in patients with primary Sjögren's syndrome (repurpss-i): A placebo-controlled, double-blinded, randomised clinical trial. *Rheumatology Department, University Medical Center Utrecht, Utrecht, Netherlands*.
44. Drosos, A.A., Skopouli, F.N., Costopoulos, J.S., Papadimitriou, C.S., Moutsopoulos, H.M. (1986). Cyclosporin A (cya) in primary Sjogren's syndrome: A double blind study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 45(9), 732-735. [\[CrossRef\]](#)
45. Devauchelle-pensec, V., Mariette, X., Jousse-joulin, S., Berthelot, J.M., Perdriger, A., Puéchal, X., Saraux, A. (2014). Treatment of primary Sjögren syndrome with rituximab. *Annals of Internal Medicine*, 160(4), 233-242. [\[CrossRef\]](#)
46. Faustman, D.L., Vivino, F.B., Carsons, S.E. (2014). Treatment of primary Sjögren syndrome with rituximab. *Annals of Internal Medicine*, 161(5), 376. [\[CrossRef\]](#)



2013-2024 YILLARI ARASINDA FDA ONAYI ALMIŞ ANTİDEPRESANLAR VE YENİ ANTİDEPRESAN İLAÇ GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI

FDA APPROVED ANTIDEPRESSANTS AND NEW ANTIDEPRESSANT DRUG DEVELOPMENT STUDIES BETWEEN 2013-2024

Mert KARACIK¹ , Begüm EVRANOS AKSÖZ^{1*} 

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

ÖZ

Amaç: Depresyon, insan hayatının herhangi bir döneminde ortaya çıkabilecek, psikiyatrik bir hastalıktır. Antidepresanlar, depresyonun birinci basamak tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Depresyonun antidepresanlarla tedavisi, tedavi süresinin uzun olması, depresyonun tedaviye direnç geliştirmesi ve antidepresan kullandıktan sonra hastada yan etkilerin görülmesi nedeniyle olumsuz sonuçlanabilmektedir. Tedavide başarı oranının artması için mevcut antidepresanların geliştirilmesi şarttır.

Sonuç ve Tartışma: İlaç araştırma ve geliştirme çalışmalarının amaçlarından biri de ilaçların daha verimli kullanılmasını sağlamaktır. Son 11 yılda FDA tarafından onaylanan antidepresanlar incelendiğinde çoğunlukla daha önceden geliştirilmiş olan ilaçların farklı dozaj şekillerinin hazırlanmasıyla, spesifik bir izomer kullanılarak ya da steroid yapılı nöroaktif bir madde olan allopregnanolon benzeri maddeler geliştirilmesi şeklinde çalışmalar yapıldığı görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antidepresan ilaçlar, Gıda ve İlaç Dairesi, ilaç geliştirme

ABSTRACT

Objective: Depression is a psychiatric illness that can occur at any time of a person's life. Antidepressants are medications used in the first-line treatment of depression. Treatment of depression with antidepressants can be unfavorable due to the long duration of treatment, the development of resistance to treatment and the occurrence of side effects in the patient after taking antidepressants. Improvements to existing antidepressants are essential to increase the success rate of treatment.

Result and Discussion: One of the aims of drug research and development is to ensure more efficient use of drugs. When the antidepressants approved by the FDA in the last 11 years are analyzed, it is seen that most of the studies were carried out by preparing different dosage forms of previously developed drugs, using a specific isomer or developing allopregnanolone-like substances, which is a steroidal neuroactive substance.

Keywords: Antidepressant Drugs, drug development, Food and Drug Administration

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Begüm Evranos Aksöz
e-posta / e-mail: begumevranos@gmail.com, begumaksoz@sdu.edu.tr, Tel. / Phone: +902462110343

Gönderilme / Submitted : 22.05.2024

Kabul / Accepted : 08.10.2024

Yayınlanma / Published : 20.01.2025

GİRİŞ

Depresyon, fiziksel (uyku ve iştah sorunları), duygusal (zevk alamama ve normalden fazla değersizlik hissi) ve bilişsel (hafıza ve motor fonksiyonlarında azalma) semptomlarla karakterize olan psikiyatrik bir bozukluktur [1].

Depresyonun bir insanın ömrü boyunca görülme oranının ortalama %15-17 arasında olduğu ve bunu cinsiyete oranladığımızda depresyonun görülme sıklığının kadınlarda erkeklere kıyasla neredeyse iki kat daha yaygın olduğu gözlenmiştir [2,3]. Özellikle COVID-19 salgınıyla birlikte Çin, Birleşik Krallık, Amerika ve İspanya'da yapılan çalışmalarda depresif dönem geçiren kişilerde belirgin bir artış olduğu belirlenmiştir [4].

Antidepresanlar, melankoli hali, uykusuzluk veya aşırı uyku durumu, kendine güven eksikliği ve ilgi kaybı gibi depresyon semptomlarını azaltmak amacıyla kullanılan ilaçlardır. Antidepresanlar, depresyon, obsesif-kompulsif bozukluk (OKB), anksiyete bozuklukları, travma sonrası stres bozukluğu (TSSB) gibi birçok psikiyatrik rahatsızlığı tedavi etmekte kullanılan en iyi psikofarmakolojik bileşiklerdir. Bu psikofarmakolojik bileşiklerin depresyon tedavisinde kullanıldığı sayısız klinik çalışma ve profesyonel gözlem ile ispatlanmıştır [5]. COVID-19 ile depresyon vakalarındaki artış yeni antidepresan onaylarına zemin hazırlamıştır [4]. Antidepresan ilaçlar; trisiklik antidepresanlar (TCA), monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI), seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI), serotonin ve noradrenalin geri alım inhibitörleri (SNRI), dopamin-norepinefrin geri alım inhibitörleri, serotonerjik antidepresanlar, noradrenerjik ve spesifik serotonerjikler (NaSSA), noradrenalin geri alım inhibitörleri (NRI) olacak şekilde sınıflandırılmıştır [2]. TCA'lar serotonin ve noradrenalin geri alımını engellerken, MAOI'ler monoamin oksidaz enzimini inhibe ederek serotonin, dopamin ve noradrenalinin parçalanmasını önlemektedir. SSRI'lar, serotonin geri alımını spesifik olarak inhibe ederler, SNRI'lar ise hem serotonin hem de noradrenalin geri alımını inhibe ederler. Dopamin-norepinefrin geri alım inhibitörleri dopamin ve noradrenalin düzeylerini artırırken, serotonerjik antidepresanlar serotonin reseptörlerine direkt etki ederler. Bu mekanizmalar, depresyon ve diğer zihinsel bozuklukların tedavisinde beyindeki nörotransmitter dengesini yeniden sağlamayı amaçlar. NaSSA, hem noradrenalin hem de serotonin salınımını artırarak depresyon belirtilerini hafifletir, NRI ise noradrenalin geri alımını inhibe ederek bu nörotransmitterin seviyelerini yükseltir [6-8].

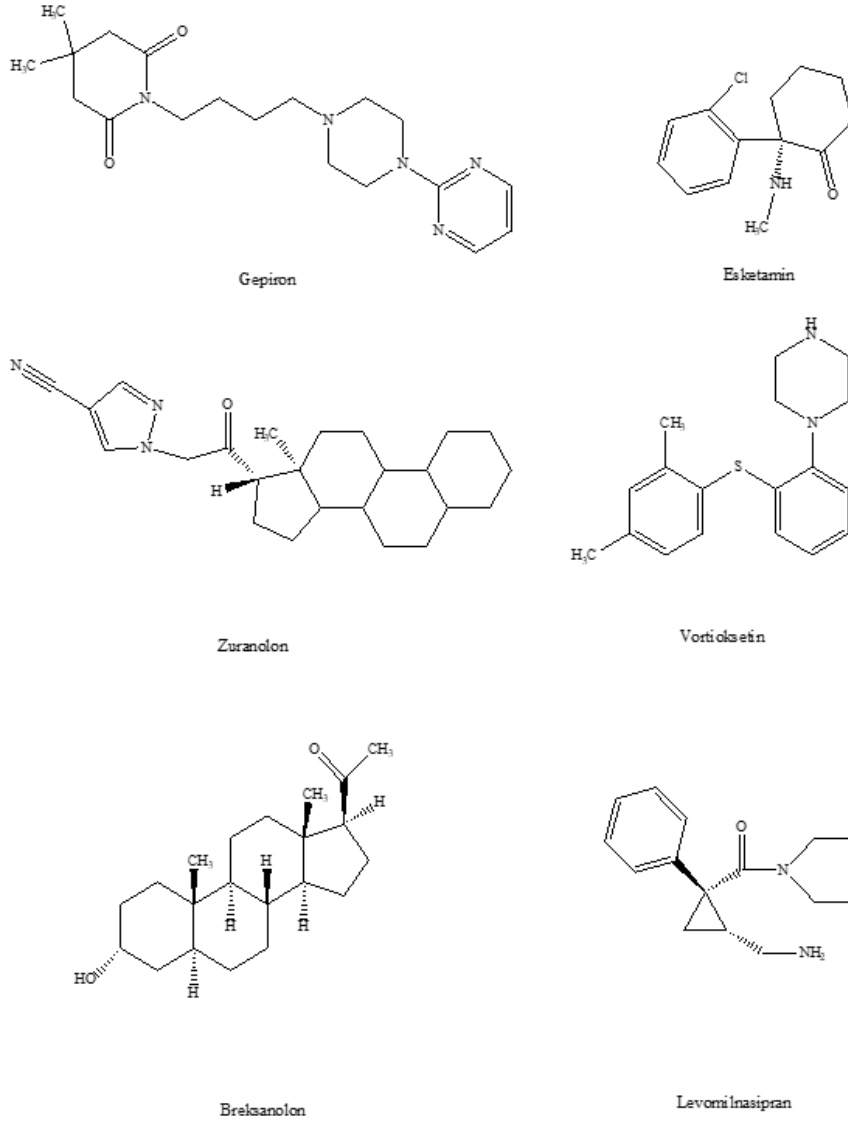
Depresyonun tedavisi için kullanılan antidepresanların istenilen yanıtı vermesi için birkaç hafta geçmesi gerekmektedir [9]. Kullanılan antidepresanlar tedaviye direnç geliştirebildiğinden, ayrıca bulantı, sindirim sorunları, ağız kuruluğu, cinsel işlev bozuklukları, kilo alımı ve/veya kilo kaybı gibi yan etki profilleri nedeniyle hastanın ilaca uyuncu azalabilmektedir [10]. Antidepresan tedavisinin başarı oranının artması ve yan etki profillerinin azaltılması için yeni antidepresan ilaç moleküllerinin keşfi ve mevcut tedavilerde kullanılan antidepresanların geliştirilmesi gerekir. Bu çalışmada, ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarına katkıda bulunmak amacıyla 2013-2024 yılları arasında FDA tarafından onay alan antidepresan molekülleri ve bu moleküller üzerinde yapılan çalışmalar incelenmiştir.

2013-2024 Yılları Arasında FDA Tarafından Onaylanan İlaçlar

2013-2024 yılları arasında sırasıyla; gepiron, zuranolon, breksanolon, esketamin, vortiooksetin ve levomilnasipran FDA tarafından antidepresan ilaç olarak onaylanmıştır. 2013-2024 yılları arasında FDA'dan onay alarak depresyon tedavisinde kullanılan ilaçlar Şekil 1'de verilmiştir.

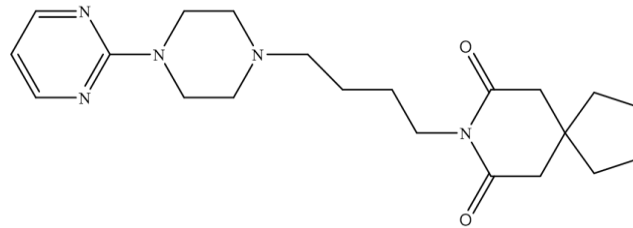
Gepiron

Gepiron (4,4-dimetil-1-{4-[4-(pirimidin-2-il) piperazin-1-il]butil}piperidin-2,6-dion), 1986 yılında Bristol-Myers Squibb firması tarafından sentezlenmiş olan, uzatılmış salınlı formülasyonu geliştirilmeden önce, yeni bir antidepresan olarak potansiyel bir aday olamayan bir bileşiktir. Fabre-Kramer Pharmaceuticals, tarafından uzatılmış salınlı formu geliştirildikten sonra, Gepirone HCL uzatılmış salınlı (EXXUA®), psikiyatrik bozuklukların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır [11-13]. Gepiron, post sinaptik 5-HT1A reseptörüne seçici etkili ve kısmi agonist aktiviteye sahip, azapiron türevi bir bileşiktir [13] (Şekil 1).



Şekil 1. 2013-2024 yılları arasında FDA onayı alan antidepresan ilaçlar

Gepiron, buspironun (Şekil 2) farmakolojik bir türevidir. Bu iki bileşik kimyasal yapıları (Şekil 1, Şekil 2) ve farmakolojik profilleri açısından benzerdir. Her ikisi de azapiron sınıfına ait olup, başlıca serotonin 5-HT_{1A} reseptörlerinin kısmi agonistleri olarak işlev görmektedir. Gepironun antikolinerjik ve sedatif aktiviteye sahip olmaması ve kullanımına bağlı belirgin bir kilo artışı oluşturmaması, gepirona diğer antidepresan ilaçlara karşı üstünlük sağlamıştır [14]. Bileşik, 28 Eylül 2023'te majör depresif bozukluğu olan yetişkin hastaların tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır [11].



Şekil 2. Buspiron'un yapısı

Zuranolon

Zuranolon (1-[2-[(3*R*,5*R*,8*R*,9*R*,10*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3-hidroksi-3,13-dimetil-2,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14,15,16,17-tetradekahidro-1*H*-siklopenta[*a*]fenantren-17-il]-2-oksoetil]pirazo-4-karbonitril), piyasaya Zurzavae markasıyla çıkan, steroid yapılı nöroaktif bir bileşiktir. γ -Amino-bütirik asit (GABA), merkezi sinir sistemindeki (MSS) birincil inhibitör nörotransmitterdir ve beynin nöronal dengesinin korunmasında kritik bir rol oynamaktadır [15].

Zuranolon (Şekil 1), organizmada progesterondan hareketle sentezi gerçekleştirilen allopregnanolonu (Şekil 3) taklit etmek üzere tasarlanmış bir bileşiktir ve allopregnanolon gibi endojen nöroaktif steroidler, GABA reseptörleri üzerinde modülatör etki gösterirler [16]. Nöroaktif steroid yapısı taşıyan bileşiklerin (Şekil 3) GABA-A reseptörlerinin güçlü aktivatörleri olarak öncü bileşik olma potansiyeli yüksektir [12]. Zuranolon, GABA-A reseptörünün pozitif allosterik modülatörüdür [16]. Zuranolon, FDA tarafından 4 Ağustos 2023 tarihinde onay almış, doğum sonrası depresyon tedavisinde kullanılan bir ilaç molekülüdür [13].

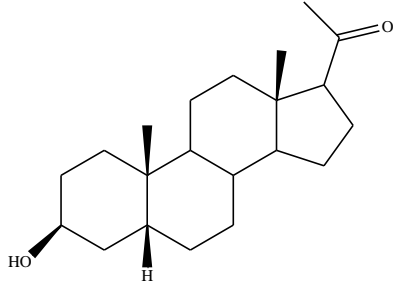
Allopregnanolon

Allopregnanolon (1-[(3*R*,5*S*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3-hidroksi-10,13-dimetil-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradekahidro-1*H*-siklopenta[*a*]fenantren-17-il]etanon) (Şekil 3), hem sinaptik hem de ekstrasinaptik GABA-A reseptörlerinin pozitif allosterik modülatörü olan steroid yapılı nöroaktif bir bileşiktir [17]. Allopregnanolon, 3 α -hidroksi-pregnan türevi olan bir nörosteroiddir ve insan vücudunda 5 α -redüktaz ve 3 α -hidroksisteroid oksidoredüktaz (3 α -HSOR) tarafından sıralı olarak indirgenerek üretilir [18]. Allopregnanolon, GABA-A reseptörleri güçlendirir ve ekstrasinaptik GABA-A reseptör ekspresyonunu artırır [19]. Güncel çalışmalar, allopregnanolon seviyesindeki değişikliklerin depresif ve anksiyete benzer davranışlarla ilişkili olabileceğini ve etkili bir antidepresan tedavisinden sonra allopregnanolon seviyesinin normale döndüğünü göstermiştir [20]. Bu nedenle, allopregnanolonun depresyon ve anksiyetede terapötik potansiyeli bulunmaktadır. Breksanolon (1[(3*R*,5*S*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3-hidroksi-10,13-dimetil-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradekahidro-1*H* siklopenta[*a*]fenantren-17-il]etanon), nöronal uyarılabilirliği modüle eden steroid yapılı nöroaktif bir bileşik olan allopregnanolonun (Şekil 3) enjekte edilebilir, çözünür ve tescilli formülasyonudur [21]. Breksanolon (Şekil 1), Mart 2019'da yetişkin kadınlarda depresyonun tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır [16].

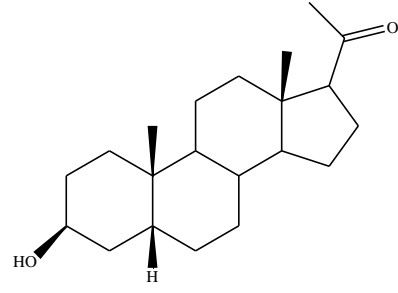
Esketamin

Tedaviye Dirençli Depresyon (TDD), majör depresif bozukluğu olan kişilerin yaklaşık %30'unun bulunduğu, birden fazla antidepresanın kullanılmasına rağmen iyileşme gözlenmeyen ve maluliyete neden olan bir hastalıktır [22]. Günümüzde, TDD için çok az müdahale imkânı olduğundan yeni tedavi yaklaşımları gerekmektedir [23]. TDD tedavisinde, devam eden tedavide kullanılan antidepresanın değiştirilmesi veya başka bir antidepresanla kombinasyonu ve ikinci nesil antipsikotiklere başlanması gibi seçenekler bulunmaktadır [22,23].

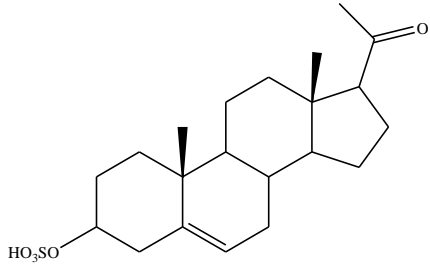
FDA tarafından ilk kez 1970 yılında onaylanan ketamin, rasemik karışımdır ve temelde anestezi ajanı olarak kullanımı olmasına rağmen düşük dozlarda antidepresan etkinliği vardır [24]. *R*-ketamin, *S*-ketamine (Şekil 4) kıyasla güçlü ve daha uzun süreli antidepresan etki göstermektedir [25]. Ketamin rasemik formda antidepresan olarak ana endikasyonu dışında kullanılırken, *S*-enantiyomeri (esketamin) ((2*S*)-2-(2-klorofenil)-2-(metilamino)sikloheksan-1-on), burun spreyi preparatı halinde Janssen Pharmaceuticals tarafından formüle edilmiş ve TDD'li yetişkinlerin tedavisi için FDA tarafından Mart 2019'da onay almıştır [26] (Şekil 1).



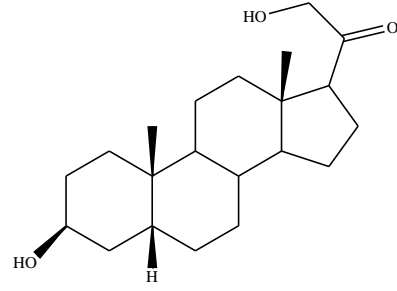
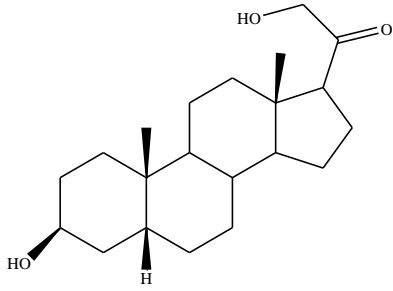
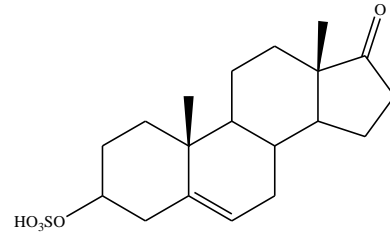
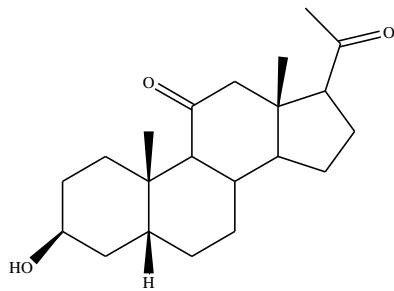
Allopregnanolon



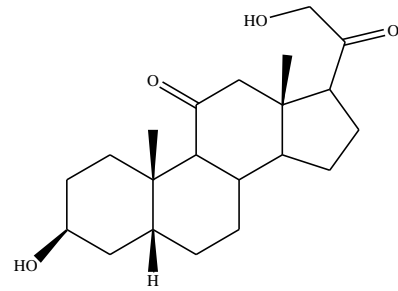
Pregnanolon



Pregnanolon Sülfat

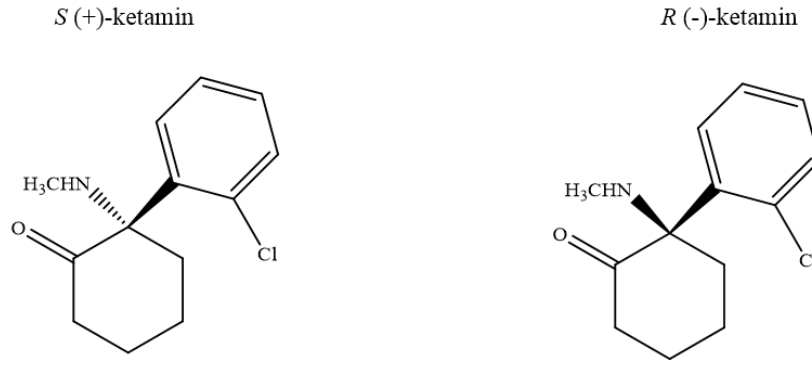
Allotetrahydro 11-
deoksi-kortikosteronTetrahydro 11-
deoksi-kortikosteronDehidroepandrasteron
sülfat

Alfaksalon



Alfadalon

Şekil 3. Endojen nöroaktif steroidlerin yapısı



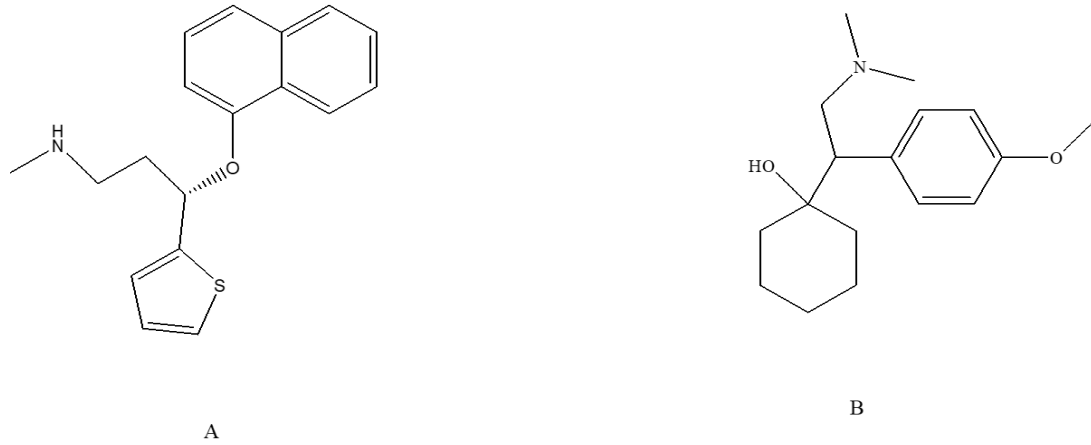
Şekil 4. Ketamin: *R* ve *S* izomerlerinin formülleri

Vortioksetin

Vortioksetin (1-[2-(2,4-dimetilfenil)sülfanilfenil]piperazin), Eylül 2013'te FDA tarafından yetişkinlerde majör depresif bozukluğun tedavisi için onay almış bir moleküldür (Şekil 1). Vortioksetin, 5-HT₃ (5-hidroksitriptamin 3), 5-HT₇ ve 5-HT_{1D} antagonisti, 5-HT_{1A} agonisti ve 5-HT_{1B} kısmi agonisti olan çoklu etki profiline sahip bir ilaçtır [27,28]. Vortioksetinin etki mekanizması tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, etkilediği reseptörler sayesinde serotonin, histamin, asetilkolin, dopamin ve noradrenalin seviyelerini arttırmaktadır [27,29]. Vortioksetin, çeşitli serotonin reseptörlerini etkilediği için diğer antidepresanlardan farmakolojik olarak farklıdır ve bu durum avantaj sağlamıştır [27]. 5-HT reseptörleri öğrenme ve bilişsel aktiviteler üzerinde belirgin bir role sahiptir. Vortioksetinin 5-HT₃ ve 5-HT₇ reseptörleri üzerindeki antagonist etkisi, bu ilacı kullanan majör depresif bozukluğu bulunan hastaların bilişsel aktivitelerinin iyileşmesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir [30]. Vortioksetin, tedaviye dirençli depresyonda yardımcı tedavi için kullanılabilir [31]. Vortioksetin, tedaviye dirençli depresyon tedavisinde kullanılırken tercih edilen bir ilaçtır; ancak, monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI'ler) ile birlikte kullanılmamalıdır. Çünkü MAOI'leri, serotonin, dopamin ve noradrenalin düzeylerini artırarak etki gösterir ve bu kombinasyon, serotonin sendromu riskini artırabilmektedir. Serotonin sendromu, vücutta olması gerekenden fazla serotonin bulunması ile karakterize olup, zihinsel durum değişiklikleri, kas sertliği, titreme ve ateş gibi potansiyel olarak hayatı tehdit eden semptomlarla kendini gösteren bir durumdur. Bu nedenle, vortioksetin tedavisi sırasında MAOI kullanımından kaçınılması gerekmektedir [29].

Levomilnasipran

Levomilnasipran, ((1*S*,2*R*)-2-(aminometil)-*N,N*-dietyl-1-fenilsiklopropan-1-karboksamid), Temmuz 2013'te FDA tarafından yetişkinlerde majör depresif bozukluğun tedavisi amacıyla onay alan milnasipranın aktif enantiyomeridir. Levomilnasipran seçici bir serotonin ve norepinefrin geri alım inhibitörüdür (SNRI), fakat norepinefrin geri alımını inhibe etme özelliği serotonin geri alımını inhibe etme özelliğinden daha fazla seçicidir (Şekil 1). Bu özelliği levomilnasipranı diğer SNRI ilaç moleküllerinden farklı kılmaktadır. Duloksetin veya venlafaksin (Şekil 5) ile karşılaştırıldığında norepinefrin ve serotonin geri alım inhibisyonuna seçiciliği 15 kat daha fazladır [32]. Ayrıca Duloksetin ve venlafaksin her ne kadar SNRI sınıfı ilaçlar olsalarda, düşük dozda alındıklarında yalnızca 5-HT geri alım inhibisyonu sağlarlar, norepinefrin geri alımını inhibe etmek için ise daha yüksek dozlarda duloksetin ve venlafaksin kullanımı gerekmektedir [33,34]. Son çalışmalar, levomilnasipranın güçlü antidepresan aktivite gösterdiğini ve bu etkinliğini, beyinden türeyen sinirsel büyüme faktörü/tirosin kinaz B reseptörü (BDNF/TrkB) aracılı fosfatidilinozitol 3 kinaz (PI3K) yolağını düzenleyerek gerçekleştirebileceğini düşündürmektedir [35].



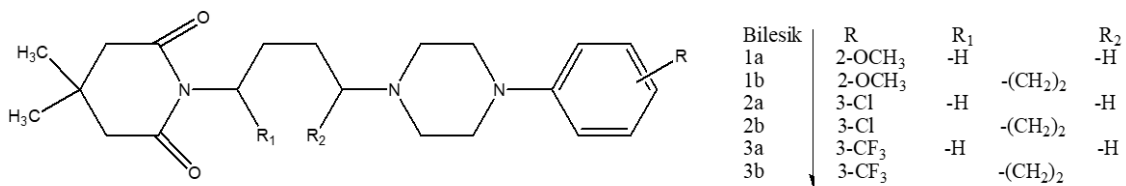
Şekil 5. Duloksetin (A) ve venlafaksinin (B) yapısı

Son 11 Yılda FDA'dan Onay Almış Antidepresanlar Kullanılarak Yapılan Yeni İlaç Geliştirme Çalışmaları

Gepiron Benzeri Türevlerin Geliştirilmesi

Paluchowska ve ark. (2005) aril piperazin iskeletini kullanarak (Şekil 6) gepiron benzeri türevler sentezlemişlerdir. Sentezledikleri bileşiklerin *in vitro* koşullar altında 5-hidroksitriptamin 1A, 5-hidroksitriptamin 2A ve dopamin D2 reseptörleri ve *in vivo* koşullar altında 5-hidroksitriptamin 1A reseptörü üzerindeki aktivitelerini değerlendirmişlerdir. *İn vitro* deneylerde, 5-HT1A reseptörleri için sıçanların hipokampus dokusu ve 5-HT2A reseptörleri için korteks dokusu kullanılmış, ayrıca dopaminerjik D2 aktivitesi için sıçanların striatal membranları kullanılmıştır. *İn vivo* deneylerde ise, Wistar sıçanları (250-300 g) veya erkek Albino Swiss fareleri (24-28 g) kullanılmıştır. Yapılan çalışmada sentez edilen tüm bileşikler *in vitro* koşullarda gepirona kıyasla daha yüksek 5-HT1A reseptör afinitesi göstermiştir. Gepironun yapısında bulunan tetrametilen yapısı uzatıldığında ise bileşiklerin 5HT2-A reseptörlerine bağlandığı gözlenmiştir. Paluchowska ve arkadaşlarının geliştirdikleri tüm bileşikler D2 reseptör tiplerinde zayıf seçici etki sergilemiştir. Sentez edilen bileşiklerin tamamı *in vivo* koşullarda presinaptik sinirler üzerinde 5-HT1A reseptörleri üzerinde agonist etki gösterirken, postsinaptik sinirler üzerindeki 5-HT1A reseptörleri üzerinde sadece 1b bileşiği (Şekil 6) antagonist etki göstermiştir [36].

Chilmonczyk ve ark (2002), “trans-8-aza-8-[4-(4-pirimidin-2-il-piperazin-1-il)sikloheksil]spiro [4.5]dekan-7,9-dion” (Bileşik 6), “trans-4,4-dimetil-1-[4-(4-pirimidin-2-il-piperazin-1-il)sikloheksil] piperidin-2,6-dion” (Bileşik 7) ve “cis-4-(4-pirimidin-2-il-piperazin-1-il)sikloheksan-1-ol” (Bileşik 8) olmak üzere üç tane gepironun rijit analogunu sentezlemişlerdir. Sentezlenen bileşiklerin 5-HT1A ve 5-HT2A reseptörleri üzerindeki afiniteleri karşılaştırılmıştır. Bileşiklerin 5-HT1A ve 5-HT2A reseptörleri üzerindeki afiniteleri, *in vitro* ortamda sırasıyla [3H] 8-OH-DPAT ve [3H] ketanserin radyoligandları kullanılarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada, Bileşik 8’in herhangi bir reseptöre afinite göstermediği, Bileşik 7’nin ise Bileşik 6’ya kıyasla 5-HT1A reseptörüne daha iyi bir afinite gösterdiği bulunmuştur [37].

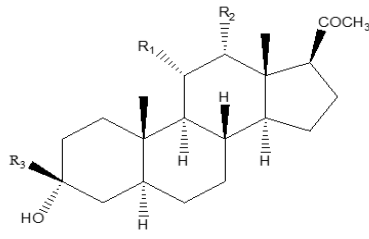


Şekil 6. Paluchowska ve ark. (2005) tarafından sentezlenen bileşikler [36]

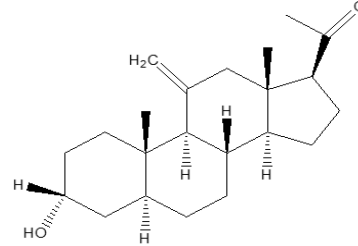
Zuranolon Benzeri Türevlerin Geliştirilmesi

Zuranolon (Şekil 1), bir endojen nöroaktif steroiddir Allopregnanolon'u taklit ederek GABA-A reseptörünü pozitif modüle ederler. Nörosteroidler, androstanlar, pregnanlar ve sülfatlı türevler (Şekil 6) olmak üzere sınıflandırılabilirler [38]. Pregnanlar ve androstanlar genellikle GABA-A reseptör fonksiyonlarını artırırken, sülfatlı türevlerin baskılayıcı etkilere sahip olabileceği belirtilmiştir [39]. GABA-A reseptörlerinin modülasyonu antidepresan aktivite gösterdiği çalışmalarla kanıtlanmıştır [13,15,17]. Zuranolonun yapısında steroid iskeleti bulunması, GABA-A reseptörlerini pozitif allosterik olarak modüle etmesini sağlarken, C19 numaralı konumuna bağlı pirazol halkasının bulunması antidepresan aktivitesini artırmıştır [40].

Slaviskova ve ark. (2013) hekojenin ve 11 α -hidroksiprogesteron başlangıç maddelerini kullanarak, 5 ξ -pregnanolonun 11- ve 12-substitüe türevlerini moleküler dokingle tasarlamış ve daha sonrasında sentezlerini yapmıştır (Şekil 7). Sentezlenen bileşiklerin GABA-A reseptörü üzerindeki etkileri *in vitro* koşullarda klorür anyonun ortama girişi ile [³H] flunitrazepam radyoligandı kullanılarak ölçülmüştür. Steroid halkasının C11 numaralı konumuna küçük nonpolar substitüentlerin eklenmesi, bileşikler etkin hale getirmiştir. 5 α -steroidlerin yapısına 11 α -OH veya polar gurupların eklenmesinin, etkinliği azalttığı bulunmuştur. 3 α -Hidroksi-11-metilen-5 α -pregnan-20-on bileşiğinin (Bileşik 56) GABA-A reseptörü üzerinde en yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur (Şekil 7) [41].



Slavikova ve ark. (2013) sentezledikleri bileşikler

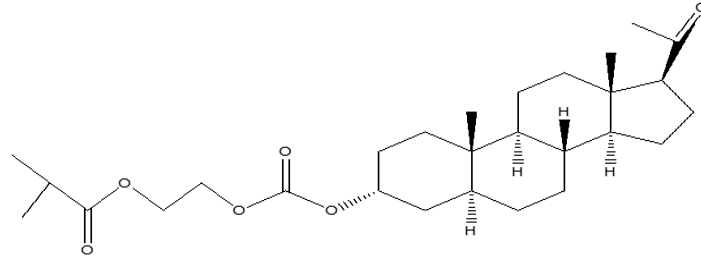


Bileşik 56

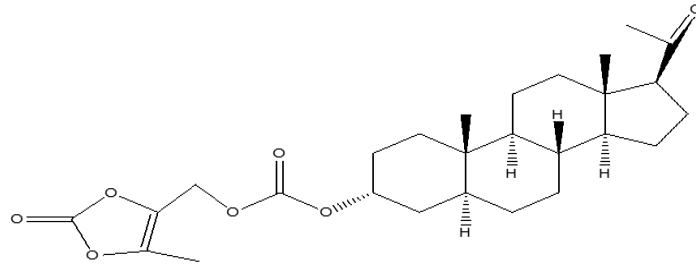
Şekil 7. Slavikova ve ark. (2013) sentezlediği bileşikler [41]

Breksanolon Benzeri Türevlerin Geliştirilmesi

Xu ve ark. (2023), metabolitleri breksanolona dönüşebilen ön ilaçlar tasarlamıştır (Şekil 8). Yapılan çalışmanın amacı, breksanolonun aşırı sedasyona yol açma ve doğum sonrası depresyon hastalarında ciddi ani bilinç kaybı ortaya çıkarma riskini azaltmak, düşük olan suda çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını artırmak, ayrıca yarılanma ömrünü uzatmaktır. Sentezlenen ön ilaçlar *in vitro* ve *in vivo* koşullar altında insan plazmasında ve karaciğer S9 hücrelerinde test edilmiştir. Breksanolonun C3 hidroksiline bağlanmak üzere yağ asidi esterleri, karbonat ve karbamat türevleri geliştirilmiştir. C3 hidroksile bağlı yağ asidi esteri yapısındaki breksanolon ön ilaçları, breksanolonun konformasyonu ve steroid iskeleti tarafından korunması nedeniyle esterlerin breksanolondan ayrılmasını ve ardından breksanolonun salınmasını gerçekleştirememiştir. C3 hidroksile bağlı karbonat ve karbamat grubu varlığı breksanolonun karaciğerde veya insan plazmasında belirgin artışına neden olmuştur. Fakat bu ön ilaçların insan plazmasında stabil kalırken, karaciğer hücrelerinde stabil kalmadığı gözlenmiştir. Bu problemi çözmek için, sentezlenen bileşiklere terminal ester içeren karbonat eklenmiş (Bileşik 16) ve karaciğer S9 hücrelerinde daha verimli bir salınım gözlenmiştir (Şekil 8). C3 hidroksile bağlı medoksomil karbamat grubunun varlığında elde edilen bileşiğin (Bileşik 11) ise karaciğer S9 hücrelerinde daha yavaş bir salınım gösterdiği görülmüştür [42].



Bileşik 11



Bileşik 16

Şekil 8. Xu ve ark. (2023) sentezlediği bileşikler [42]

Ketamin Benzeri Türevlerin Geliştirilmesi

Ketamin, (*S*+) -ketamin ve (*R*-) -ketamin enantiyomerlerinden oluşan rasemik karışımdır. (*S*+) ve (*R*-) -ketaminin birbirinden farklı farmakokinetik profilleri ve etki mekanizmaları vardır [43] (Şekil 4). Ketamin, *N*-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörünün fenilsiklidin bağlanma bölgesine (MK-801) bağlanarak NMDA reseptörünü nonkompetitif olarak antagonize eder ve böylece analjezik, psikomimetik, anestezi, dissosiyatif ve antidepresan etkiler gösterir [44]. Ketaminin çoğu (80%), *N*-demetilasyon yoluyla hızlı bir şekilde norketamine metabolize olur. Diğer metabolitler ise dehidronorketamin (DHNK) ve hidrosinorketamindir (HNK) [45].

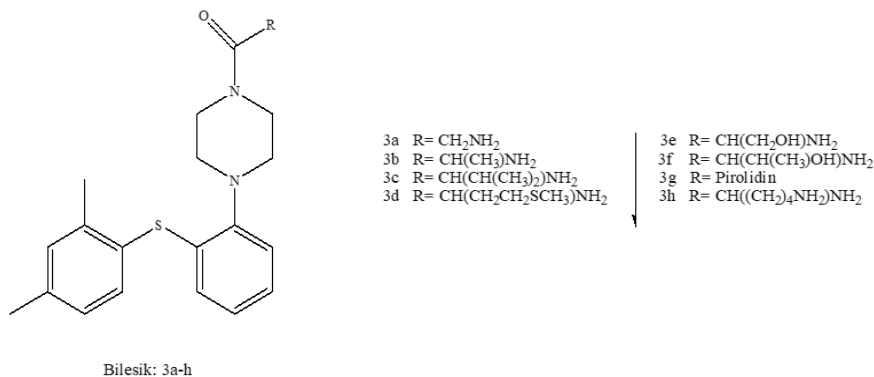
Morris ve ark. (2017) ketamini başlangıç maddesi kullanarak hidrosinorketamin türevleri sentezlemiştir [46]. Ketaminin depresyon tedavisi için büyük bir potansiyeli bulunsa da sedatif ve dissosiyatif yan etkileri kullanımını sınırlamaktadır [47]. Yapılan çalışmanın amacı ketaminin yan etkilerinden kaçınılması için kullanımını arttırmak olmuştur. Bu amaçla ketaminin metabolitleri üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışmada sentezlenen HNK'lar *in vitro* koşullarda NMDA reseptörünün MK-801 bağlanma bölgesine karşı test edilmiş ve her bir metabolitin bu bölgeye olan bağlanma gücü belirlenmiştir. Bu çalışmada sentezlenen bileşiklerden sadece (*2S,6S*) HNK, NMDA reseptörünün MK-801 bölgesi üzerinde anlamlı etki göstermiştir. Yapılan bir başka çalışmada Chen ve ark. (2020) ketamin metabolitlerinin enantiyomerlerinin klinik çalışmalarda farklı terapötik etkilerinin bulunabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada HNK'lar fareler üzerinde stres modeli kullanılarak test edilmiştir. Yapılan çalışmada, (*2R,6R*)-HNK'nın cinsiyet fark etmeksizin farelerde depresyon benzeri davranışları önlediği, (*2S,6S*)-HNK'nın ise erkek farelerde öğrenilmiş korku tepkisini azalttığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada ketaminin metabolitlerinin enantiyomerleri arasında yan etki profilleri de incelenmiştir. (*2S,6S*)-HNK'nın farelerde 25 mg/kg dozunda NMDA reseptörü inhibisyonuna bağlı yan etkilere neden olduğu, (*2R,6R*)-HNK'nın ise rasemik ketamin'den daha az yan etkiye sahip olduğu saptanmıştır [48]. Fakat, klinik olarak yüksek konsantrasyonda (*2R,6R*)-HNK düzeylerinin daha zayıf antidepresan yanıtı ile ilişkilendirildiği ve düşük konsantrasyonda ise daha iyi antidepresan yanıtı ile ilişkilendirildiği bulunmuştur [46,48]. Bu bulgu bize, (*2R,6R*)-HNK'nın antidepresan aktivitesinin doza bağlı olduğunu göstermektedir.

2018 yılında yapılan bir tez çalışmasında, (2*R*,6*R*)-HNK'nin antidepresan etkinliği hakkında literatür taraması yapılmıştır. Bu tez çalışmasında, (2*R*,6*R*)-HNK'nin tedaviye dirençli depresyon popülasyonlarında oldukça etkili olabileceği belirtilmiştir [49].

Li ve ark. (2024) moleküler doking yöntemiyle bir dizi ketamin türevini tasarlamıştır. Tasarlanan moleküller daha sonrasında sentezlenmiştir. Sentezlenen ketamin analoglarının NMDA reseptörü üzerindeki aktiviteleri, elektrofizyolojik deneyler aracılığıyla tespit edilmiştir. Ketamin analoglarının etkinliği, HEK293 hücreleri üzerinde test edilmiştir. Yapılan çalışmada 2-(2-klorofenil)-2-(etilamino)sikloheptan-1-on hidroklorür ve 2-(2-klorofenil)-2-(metilamino)sikloheptan-1-on'un ketamine kıyasla NMDA reseptörü üzerinde daha iyi bir aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir [50].

Vortioksetin Benzeri Türevlerin Geliştirilmesi

Mo ve ark. (2021), vortioksetinden hareketle amino asitle modifiye edilmiş ön ilaçları tasarlamış ve daha sonrasında sentezlenmiştir [51] (Şekil 9). Vortioksetin, 5-hidroksitriptamin reseptörlerini inhibe eden çoklu etki profili olan, antidepresan bir bileşiktir ve 5-hidroksitriptamin reseptörleri, beyin hücrelerinde bulunmakla birlikte barsak epitel hücrelerinde de bulunmaktadır. 5-Hidroksitriptamin reseptörlerinin gastrointestinal motiliteyi etkilediği çeşitli çalışmalarla ispat edilmiştir [52,53]. Vortioksetinin, gastrointestinal sistem üzerinde çeşitli yan etkileri bulunur ve buradaki en yaygın yan etkisi mide bulantısıdır [51]. Bu yan etkilerin vortioksetinin 5-hidroksitriptamin reseptörleri üzerindeki etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir [53]. Mo ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada, vortioksetinin ön ilaçlarını sentezleyerek, vortioksetinin gastrointestinal sistem içerisindeki 5-hidroksitriptamin reseptörlerine bağlanmasını engellemeyi, böylece vortioksetinin gastrointestinal sistem üzerindeki yan etkilerini azaltarak hasta uyuncunu arttırmayı amaçlamışlardır [51]. Yapılan çalışmada sentezlenen bileşiklerin, serotonin taşıyıcı inhibitör (SERT) aktivitelerini test etmek için *in vitro* ortamda RBL-2H3 hücre kültürleri ve gastrointestinal sistem üzerindeki stabilitesini test etmek için ise simüle edilmiş mide sıvısı (pH 2.0) ve simüle edilmiş bağırsak sıvısı (pH6.8) kullanılmıştır. Vortioksetin zayıf bir çözünürlüğe sahiptir. Yapılan çalışmada, sentezlenen tüm ön ilaçlar, vortioksetinle kıyaslandığında çözünürlüğünde hafif bir iyileşme gözlenmiştir. Mo ve ark. (2021) bileşiklerin SERT inhibitör aktivitelerini kıyasladığında, bileşik 3h'nin SERT inhibisyon aktivitesinin vortioksetine kıyasla daha iyi olduğunu, bileşik 3a, 3b, 3c ve 3e'nin (Şekil 9) ise SERT inhibisyon aktivitesinin vortioksetine benzer aktivite sergilediğini gözlemlemişlerdir. Sentezlenen tüm ön ilaçlar simüle edilmiş mide sıvısı ve simüle edilmiş bağırsak sıvısı içerisinde test edilmiştir ve test süresi boyunca ön ilaçların %90'ından fazlasının korunduğu görülmüştür. Böylece, sentezlenen bileşiklerin gastrointestinal sistemde yeterince kararlı olduğu sonucuna varılmıştır [51].

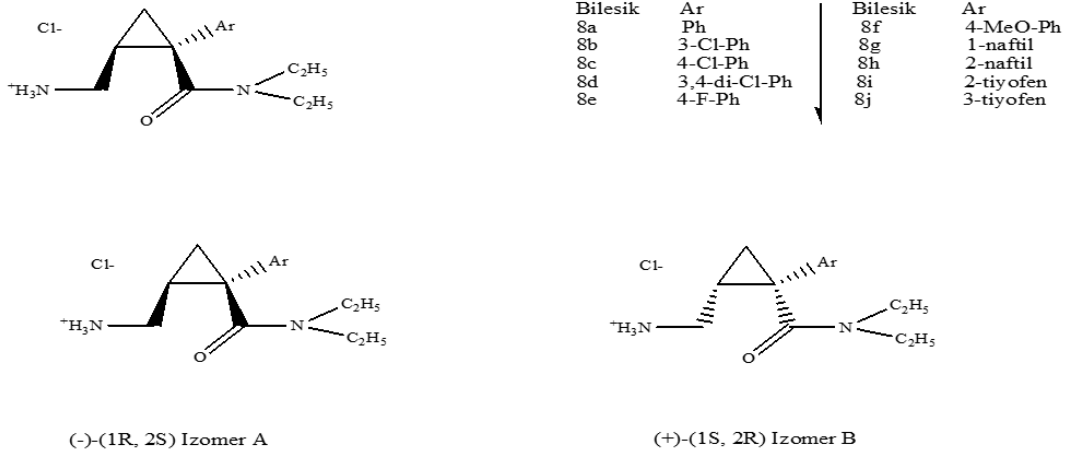


Şekil 9. Mo ve ark. (2021) tarafından sentezlenen bileşikler [51]

Milnaspiran Benzeri Türevlerin Geliştirilmesi

Milnaspiran bir serotonin ve norepinefrin geri alım inhibitörü ve zayıf NMDA reseptör antagonisti olarak antidepresan aktivite gösterir [54–56]. Roggen ve ark. (2007) milnaspiran analoglarını enantiyometrik olarak sentezlemiş ve bu bileşiklerin serotonin taşıyıcı proteini (SERT), noradrenalin

taşıyıcı proteini (NET) ve dopamin taşıyıcı proteini (DAT) inhibe edici etkilerini incelemişlerdir [57] (Şekil 10). Sentezlenen bileşiklerin SERT, NET ve DAT inhibe etme özelliklerini test etmek için sıçan kortikal sinaptozomlarında [³H]-5-HT alımının ölçüldüğü bir prosedür kullanılmıştır [58]. Yapılan çalışmada, 6a bileşiğinin enantiyomerleri arasında belirgin potens farkı gözlenmiştir. NET inhibe etme özelliği izomer B serisinin, izomer A serisine kıyasla 20 kat daha yüksek olduğu gözlenmiştir. (-)-(1*R*,2*S*) naftil analogunun (8h) sentezlenen bileşikler arasında en yüksek etkinlik gösterdiği ve SERT, NET ve DAT'ın üçlü geri alım inhibitörü olduğu belirlenmiştir [57].



Şekil 10. Roggen ve ark. (2007) sentezledikleri bileşikleri [57]

SONUÇ VE TARTIŞMA

Depresyon küresel çapta yaygınlaşan bir hastalıktır. Erken dönemde tedavi edilmezse, klasik depresyonun, tedaviye dirençli depresyona ve majör depresif bozukluğa dönme olasılığı yükselmektedir. Depresyon, kişiyi intihara sürüklenme, sekonder hastalıklara sebebiyet verme ve kişinin bilişsel fonksiyonlarına zarar verme gibi olumsuz etkiler söz konusu olduğunda hızlıca tedavi edilmesi gereken bir hastalıktır.

Covid-19 ile birlikte dünya genelinde depresyonun artması FDA'nın antidepresanlara yönelik bakış açısını değiştirmiştir. 2019 yılı sonrasında onay almış antidepresanlar genel anlamda geleneksel antidepresanlara kıyasla daha hızlı etki göstermektedir. Ayrıca GABA-A reseptörünün antidepresan aktivitesinin keşfedilmesiyle birlikte farklı depresyon tiplerine (doğum sonrası depresyon) müdahale için ilaç geliştirme çalışmaları hızlanmıştır.

Genel anlamda antidepresanların, yan etki profilleri benzerlik göstermektedir ve bu yan etkiler hasta uyuncunu azaltmaktadır. İncelenen literatürlerde çoğunlukla bilinen ilaçların ön ilaçları veya metabolitleri üzerinden çalışmalar yapıldığı ve mevcut ilaçların yan etki profillerini azaltmanın ana amaç olduğu görülmüştür.

Esketamin ve levomilnasipran antidepresan aktivite açısından aktif enantiyomerler olmasına rağmen incelenen literatürlerde yapılan çalışmalarda her iki bileşiğin diğer enantiyomerleride etkileri açısından değerlendirilmiştir.

İlaç geliştirme çalışmaları, temel araştırmalar, klinik öncesi araştırmalar, klinik araştırmalar ve tedavi onayı olacak şekilde sınıflandırılabilir. Bu derlemede, temel araştırmalar ve klinik öncesi araştırmalarla ilgili literatür çalışması yapılmıştır. Burada verilen ilaçların ve özelliklerinin yeni ilaç geliştirilme çalışmalarında faydalı olabileceği düşünülmektedir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: M.K., B.E.A.; Tasarım: M.K.; Denetim: M.K., B.E.A.; Kaynaklar: M.K., B.E.A.; Malzemeler: - ; Veri Toplama ve/veya İşleme: M.K., B.E.A.; Analiz ve/veya Yorumlama: M.K., B.E.A.;

Literatür Taraması: M.K., B.E.A.; Makalenin Yazılması: M.K., B.E.A.; Kritik İnceleme: B.E.A.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Dean, J., Keshavan, M. (2017). The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian Journal of Psychiatry*, 27, 101-111. [\[CrossRef\]](#)
2. Yüzbaşıoğlu, D., Avuloğlu, Y.E., Ünal, F. (2016). Antidepresan ilaçlar ve genotoksisite. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 9(1), 17-28.
3. Uluğ, B., Özyüksel, B. (2007). Depresyon tanısı alan hastalarda kalıntı belirtilerin yetiyitimi ile ilişkisi: 3 aylık izlem çalışması. *Türk Psikiyatri Dergisi*, 18(4), 23-329.
4. Zheng, Y., Chang, X., Huang, Y., He, D. (2023). The application of antidepressant drugs in cancer treatment. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 157, 113985. [\[CrossRef\]](#)
5. Temel, M.K. (2019). Modern psikososyoklinik etmenlerin eseri “Antidepresan kullanım bozukluğu” tıp etiğince sorun teşkil eden bir olgu. *Anadolu Kliniği Tıp Bilimleri Dergisi*, 24(3), 206-216.
6. Erdoğan, Ç., Rezaki, Ö.H., Koçak, M.O., Buturak, V.Ş. (2020). Farklı etki mekanizmasına sahip antidepresanların etkinlik, bilişsel işlevler ve yan etki açısından karşılaştırılması. *Türk Psikiyatri Dergisi*, 31(2), 90-98.
7. Artigas, F., Nutt, D.J., Shelton, R. (2002). Mechanism of action of antidepressants. *Psychopharmacology Bulletin*, 36(2), 123-132.
8. Jaime, B.H., Sánchez-Salcedo, J.A., Estevez-Cabrera, M.M., Jiménez, T.M., Cortes-Altamirano, J.L., Rodríguez, A.A. (2022). Depression and pain: Use of antidepressants. *Current Neuropharmacology*, 20(2), 384-402. [\[CrossRef\]](#)
9. de Oliveira Costa, J., Gillies, M.B., Pearson, S.A. (2022). Changes in antidepressant use in Australia: A nationwide analysis (2015–2021). *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, 57(1), 49-57. [\[CrossRef\]](#)
10. Kornhuber, J., Gulbins, E. (2021). New molecular targets for antidepressant drugs. *Pharmaceuticals*, 14(9), 894. [\[CrossRef\]](#)
11. Voineskos, D., Daskalakis, Z.J., Blumberger, D.M. (2020). Management of treatment-resistant depression: Challenges and strategies. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 16, 221-234. [\[CrossRef\]](#)
12. Keam, S.J. (2023). Gepirone extended-release: First approval drugs. *Adis Journals*, 83(18), 1723-8. [\[CrossRef\]](#)
13. Yocca, F.D. (1990). Neurochemistry and neurophysiology of buspirone and gepirone: Interactions at presynaptic and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 10(3), 6-12. [\[CrossRef\]](#)
14. Wang, Y.T., Yang, P.C., Zhang, Y.F., Sun, J.F. (2024). Synthesis and clinical application of new drugs approved by FDA in 2023. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 265, 116124. [\[CrossRef\]](#)
15. Shin, C., Ko, Y.H., Shim, S.H., Kim, J.S., Na, K.S., Hahn, S.W., Lee, S.H. (2020). Efficacy of buspirone augmentation of escitalopram in patients with major depressive disorder with and without atypical features: A randomized, 8 week, multicenter, open-label clinical trial. *Psychiatry Investigation*, 17(8), 796-803. [\[CrossRef\]](#)
16. Engin, E., Benham, R.S., Rudolph, U. (2018). An emerging circuit pharmacology of GABA_A receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(8), 710-732. [\[CrossRef\]](#)
17. Frieder, A., Fersh, M., Hainline, R., Deligiannidis, K.M. (2019). Pharmacotherapy of postpartum depression: Current approaches and novel drug development. *CNS Drugs*, 33(3), 265-282. [\[CrossRef\]](#)
18. Hosie, A.M., Wilkins, M.E., Da Silva, H.M.A., Smart, T.G. (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABA_A receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*, 444, 486-489. [\[CrossRef\]](#)
19. Reddy, D.S. (2010). Neurosteroids: Endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Progress in Brain Research*, 186, 113-137. [\[CrossRef\]](#)
20. Bäckström, T., Das, R., Bixo, M. (2022). Positive GABA_A receptor modulating steroids and their antagonists: Implications for clinical treatments. *Journal Neuroendocrinology*, 34(2), e13013. [\[CrossRef\]](#)

21. Agis-Balboa, R.C., Guidotti, A., Pinna, G. (2014). 5 α -reductase type I expression is downregulated in the prefrontal cortex/brodman's area 9 (BA9) of depressed patients. *Psychopharmacology*, 231(17), 3569-3580. [CrossRef]
22. Patatanian, E., Nguyen, D.R. (2022). Brexanolone: A novel drug for the treatment of postpartum depression. *Journal Pharmacy Practice*, 35(3), 431-436. [CrossRef]
23. Erol, A. (2013). Tedaviye dirençli tek uçlu depresyonda ilaç seçimini etkileyen etmenler. *Journal of Mood Disorders*, 3(1), 7-8.
24. Ionescu, D.F., Rosenbaum, J.F., Alpert, J.E. (2015). Pharmacological approaches to the challenge of treatment-resistant depression. *Dialogues Clinical Neuroscience*, 17(2), 111-126. [CrossRef]
25. Sanacora, G., Frye, M.A., McDonald, W., Mathew, S.J., Turner, M.S., Schatzberg, A.F., Summergard, P., Nemeroff, C.B. (2017). A consensus statement on the use of ketamine in the treatment of mood disorders. *JAMA Psychiatry*, 74(4), 399-405. [CrossRef]
26. Zhang, J.C., Li, S. X., Hashimoto, K. (2014). R (-)-ketamine shows greater potency and longer lasting antidepressant effects than S (+)-ketamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 116, 137-41. [CrossRef]
27. Kim, J., Farchione, T., Potter, A., Chen, Q., Temple, R. (2019). Esketamine for treatment-resistant depression—first FDA-approved antidepressant in a new class. *The New England Journal of Medicine*, 381(1), 1-4. [CrossRef]
28. D'Agostino, A., English, C.D., Rey, J.A. (2015). Vortioxetine (Brintellix): A new serotonergic antidepressant. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(1), 36-40.
29. Pearce, E.F., Murphy, J.A. (2014). Vortioxetine for the treatment of depression. *Annals of Pharmacotherapy*, 48(6), 758-765. [CrossRef]
30. Bang-Andersen, B., Ruhland, T., Jørgensen, M., Smith, G., Frederiksen, K., Jensen, K.G., Zhong, H., Nielsen, S.M., Hogg, S., Mørk, A., Stensbøl, T.B. (2011). Discovery of 1-[2-(2,4-dimethylphenylsulfanyl)phenyl]piperazine (Lu AA21004): A novel multimodal compound for the treatment of major depressive disorder. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(9), 3206-3221. [CrossRef]
31. Schatzberg, A.F., Blier, P., Culpepper, L., Jain, R., Papakostas, G.I., Thase, M.E. (2014). An overview of vortioxetine. *Journal of Clinical Psychiatry*, 75(12), 1411-1418. [CrossRef]
32. U.S. Food and Drug Web site. (2024). Erişim adresi: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=204168>. Erişim tarihi: 26.01.2024.
33. Asnis, G.M., Henderson, M.A. (2015). Levomilnacipran for the treatment of major depressive disorder: A review. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 11, 125-135. [CrossRef]
34. Kishi, T., Ikuta, T., Sakuma, K., Okuya, M., Hatano, M., Matsuda, Y., Iwata, N. (2023). Antidepressants for the treatment of adults with major depressive disorder in the maintenance phase: A systematic review and network meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 28(1), 402-409. [CrossRef]
35. Saraceni, M.M., Venci, J.V., Gandhi, M.A. (2014). Levomilnacipran (fetzima): A new serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor for the treatment of major depressive disorder. *Journal of Pharmacy Practice*, 27(4), 389-395. [CrossRef]
36. Wu, Y., Zhu, Z., Lan, T., Li, S., Li, Y., Wang, C., Feng, Y., Mao, X., Yu, Ş. (2023). Levomilnacipran improves lipopolysaccharide-induced dysregulation of synaptic plasticity and depression-like behaviors via activating BDNF/TrkB mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Molecular Neurobiology*, 61(7), 4102-4115. [CrossRef]
37. Chilmonczyk Z., Krajewski K., Cybulski J. (2002). Rigid analogues of buspirone and gepirone, 5-HT_{1A} receptors partial agonists. *Il Farmaco*, 57(11), 917-923. [CrossRef]
38. Paluchowska, M.H., Bugno, R., Bojarski, A.J., Charakchieva-Minol, S., Duszyńska, B., Tatarczyńska, E., Kłodzińska, A., Stachowicz, K., Chojnacka-Wójcik, E. (2005). Novel, flexible, and conformationally defined analogs of gepirone: Synthesis and 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, and D₂ receptor activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13(4), 1195-1200. [CrossRef]
39. Paul, S.M., Purdy, R.H. (1992). Neuroactive steroids. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 6(6), 2311-2322. [CrossRef]
40. Lambert, J.J., Beelli, D., Harney, S.C., Peters, J.A., Frenguelli, B.G. (2001). Modulation of native and recombinant GABA_A receptors by endogenous and synthetic neuroactive steroids. *Brain Research Reviews*, 37(1-3), 68-80. [CrossRef]
41. de la Torre, B.G., Albericio, F. (2023). The pharmaceutical industry in 2022: An analysis of FDA drug approvals from the perspective of molecules. *Molecules*, 28(3), 1038. [CrossRef]
42. Slavíková, B., Bujons, J., Matyáš, L., Vidal, M., Babot, Z., Křištofiková, Z., Sunol, C., Kasal, A. (2013). Allopregnanolone and pregnanolone analogues modified in the C ring: Synthesis and activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(6), 2323-2336. [CrossRef]

43. Xu, L., Ma, J., Shi, L., Li, F. (2023). Design, synthesis and characterizations of prodrugs of brexanolone. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 90, 129344. [\[CrossRef\]](#)
44. Rafał-Ulińska, A., Brański, P., Pałucha-Poniewiera, A. (2022). Combined administration of (R)-ketamine and the mGlu2/3 receptor antagonist LY341495 induces rapid and sustained effects in the CUMS model of depression via a TrkB/BDNF-dependent mechanism. *Pharmaceuticals*, 15(2), 125. [\[CrossRef\]](#)
45. Zhang, K., Yao, Y., Hashimoto, K. (2023). Ketamine and its metabolites: Potential as novel treatments for depression. *Neuropharmacology*, 222, 109305. [\[CrossRef\]](#)
46. Johnston, J.N., Henter, I.D., Zarate, C.A. (2023). The antidepressant actions of ketamine and its enantiomers. *Pharmacology and Therapeutics*, 246, 108431. [\[CrossRef\]](#)
47. Morris, P.J., Moaddel, R., Zanos, P., Moore, C.E., Gould, T., Zarate, C.A., Thomas, C.J. (2017). Synthesis and *N*-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activity of ketamine metabolites. *Organic Letters Journal*, 19(17), 4572. [\[CrossRef\]](#)
48. Chen, B.K., Luna, V.M., La Gamma, C.T., Xu, X., Deng, S.X., Suckow, R.F., Cooper, T.B., Şah, A., Brachman, R.A., Mendez-David, I., David, D.J., Gradier, A.M., Landry, D.W., Denny, C.A. (2020). Sex-specific neurobiological actions of prophylactic (*R,S*)-ketamine, (2*R,6R*)-hydroxynorketamine, and (2*S,6S*)-hydroxynorketamine. *Neuropsychopharmacology*, 45(9), 1545-1556. [\[CrossRef\]](#)
49. Fairley S. (2018). Honors thesis. Synthesis of (2*R,6R*)-Hydroxy-norketamine for evaluation of antidepressant effects. Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Mississippi, Mississippi, USA.
50. Li, S., Wen, B., Zhao W., Wang L., Chen X. (2024). Design, synthesis and biological evaluation of novel ketamine derivatives as NMDAR antagonists. *Molecules*, 29(11), 2459. [\[CrossRef\]](#)
51. Mo, X., Li, Y., Zhu, X., Li, X., Zhou, H., Bi, X., Li, J. (2021). Vortioxetine derivatives with amino acid as promoiety: Synthesis, activity, stability and preliminary pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(8), 3011-3019. [\[CrossRef\]](#)
52. Gershon, M.D. (2004). Review article: Serotonin receptors and transporters-roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacology and Therapeutics*, 20(7), 3-14. [\[CrossRef\]](#)
53. Oliva, V., Lippi, M., Paci, R., Del Fabro, L., Delvecchio, G., Brambilla, P., De Ronchi, D., Fanelli, G., Serretti, A. (2021). Gastrointestinal side effects associated with antidepressant treatments in patients with major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 109, 110266. [\[CrossRef\]](#)
54. Kishi, T., Ikuta, T., Sakuma, K., Okuya, M., Hatano, M., Matsuda, Y., Iwata, N. (2023). Antidepressants for the treatment of adults with major depressive disorder in the maintenance phase: A systematic review and network meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 28(1), 402-409. [\[CrossRef\]](#)
55. Kasper, S., Pail, G. (2010). Milnacipran: A unique antidepressant? *Neuropsychiatric disease and treatment*, 6 (Supplement 1), 23-31. [\[CrossRef\]](#)
56. Stasiuk, W., Szopa, A., Serefko, A., Wyska, E., Świąder, K., Dudka, J., Wlaź, P., Poleszak, E. (2017). Influence of the selective antagonist of the NR2B subunit of the NMDA receptor, traxoprodil, on the antidepressant-like activity of desipramine, paroxetine, milnacipran, and bupropion in mice. *Journal of Neural Transmission*, 124(3), 387-396. [\[CrossRef\]](#)
57. Roggen, H., Kehler, J., Stensbøl, T.B., Hansen, T. (2007). Synthesis of enantiomerically pure milnacipran analogs and inhibition of dopamine, serotonin, and norepinephrine transporters. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17(10), 2834-2837. [\[CrossRef\]](#)
58. Kehler, J., Juhl, K., Sejberg, J., Norgaard, M.B. (2005). 2-(1*H*-İndolylsulfanyl)-benzyl amine derivatives as SSRI. WO 2005061455 A1.



FLAVONOİTLERİN AKCİĞER KANSERİNE KARŞI ETKİLERİ

THE EFFECTS OF FLAVONOIDS AGAINST LUNG CANCER

Ömer Furkan GÜVERTİ^{1*} , Didem DELİORMAN ORHAN¹ 

¹Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 06560, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Kanser, ülkemizde ve dünyada yaygın olarak görülen, kronikleşebilen ve bulaşıcı olmayan bir hastalık türüdür. Kanser tedavisinde kemoterapi, immünoterapi, radyoterapi, fitoterapi, palyatif tedaviler ve cerrahi yöntemler kullanılmaktadır. Bu derleme flavonoitlerin akciğer kanserini önleme ve tedavi etme üzerindeki etkilerini inceleyen in vitro, in vivo ve klinik çalışma sonuçlarını değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Ayrıca flavonoitlerin hangi mekanizmalar ile akciğer kanserini önlemede ve tedavi etmede kullanıldığı araştırılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Flavonoitlerin akciğer, meme, yumurtalık, özofagus ve kolorektal kanserlerdeki etkinlikleri ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Özellikle akciğer kanserindeki etkinliklerini değerlendirmek için in vitro, in vivo ve klinik çalışma bulguları da mevcuttur. Bu bulgular ışığında flavonoitler antioksidan, antiinflamatuar, antiproliferatif aktiviteler, biyoaktifleştirici enzimlerin inhibisyonu ve detoksifiye edici enzimlerin induksiyonu dahil olmak üzere birçok etki ile antikanser aktivite göstermektedir. Bunun yanı sıra flavonoitler seçici olarak akciğer kanseri hücrelerini apoptoza teşvik ederek antikanser etki sağlamaktadırlar ve normal sağlıklı hücrelere zarar vermemektedirler. Sonuç olarak flavonoitlerin prelinik çalışmalarda akciğer karsinogenezini inhibe ettiği ve burada görevli olan sinyal yollarını hedefleme kapasitesine sahip olduğu anlaşılmakla beraber, çok daha fazla klinik çalışmanın yapılmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, flavonoit, in vitro, in vivo, klinik çalışmalar

ABSTRACT

Objective: Cancer is a type of chronic and non-contagious disease that is common in our country and in the world. Chemotherapy, immunotherapy, radiotherapy, phytotherapy, palliative treatments and surgical methods are used in cancer treatment. This review aims to evaluate the results of in vitro, in vivo and clinical studies examining the effects of flavonoids on the prevention and treatment of lung cancer. In addition, the mechanisms by which flavonoids are used to prevent and treat lung cancer were investigated.

Result and Discussion: There are many studies on the efficacy of flavonoids in lung, breast, ovarian, esophageal and colorectal cancers. In vitro, in vivo and clinical study findings are also available to evaluate their efficacy especially in lung cancer. In the light of these findings, flavonoids show anticancer activity with many effects including antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative activities, inhibition of bioactivating enzymes and induction of detoxifying enzymes. In addition, flavonoids selectively induce apoptosis of lung cancer cells, thereby providing anticancer effects and do not harm normal healthy cells. In conclusion, flavonoids inhibit lung carcinogenesis in preclinical studies and have the capacity to target the signaling pathways involved in lung carcinogenesis, but much more clinical studies are needed.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ömer Furkan Güverti
e-posta / e-mail: furkanguvertiomer@gmail.com, Tel. / Phone: +905525641224

Keywords: *Clinical trials, in vitro, in vivo, flavonoid, lung cancer*

GİRİŞ

Kanser, Dünya üzerinde en sık görülen altı hastalıktan biridir [1]. 2022 yılında yaklaşık 20 milyon yeni kanser vakası (melanom dışı cilt kanserleri [NMSC'ler] dahil) ve kanserden kaynaklanan 9.7 milyon ölüm (NMSC dahil) meydana gelmiştir [2]. Kanser, genellikle hücresel düzeydeki kontrolsüz büyüme sonucunda oluşan ve yavaş yavaş ilerleyen, çok karmaşık bir hastalıktır [3]. Kanserli hücreler kontrol mekanizmalarını kaybedip sürekli çoğalarak invazyon yaparlar ve bunun sonucunda organlarda zararlı etkiler meydana getirirler [4]. Son yapılan çalışmalar; akciğer, meme ve kolorektal kanserlerin en sık görülen üç kanser türü olduğunu göstermiştir. Bunlara ek olarak akciğer kanseri, kolorektal kanser ve mide kanseri en fazla öldürücü etkiye sahip ilk üç kanser türüdür [5]. Akciğer kanseri vakası tanısı alan hastalardan yarısı bir yıl içerisinde hayatını kaybetmektedir. Hayatta kalma olasılığı ise kanserin bulunduğu evreye göre değişkenlik göstermektedir [6]. Kanser gelişimi çok aşamalı bir süreçtir. Normal hücrelerin tam malign hale gelmesi belirli bir zaman aldığı için bu aşamalarda müdahale edilebilir [7]. Özellikle akciğer kanserinde genellikle tanı geç evrede konulduğu için cerrahi işlem tedavi için çok tercih edilmemektedir. Bu nedenle de radyoterapi ve kemoterapi bu hastalığın temel tedavisini oluşturmaktadır [8]. Ama kemoterapi hem hastaya çok fazla zarar vermektedir hem de hastalar kemoterapide kullanılan ilaçlara kolaylıkla direnç kazanabilmektedir [9].

Çok uzun yıllardır kanser hastalığının tedavisi ya tek bir yöntem kullanılarak ya da cerrahi, radyasyon ve kemoterapi yöntemlerinin kombinasyonu ile yapılmaktadır [10]. Fakat tedavinin bazı durumlarda kesin bir sonuç vermediği ve bazen de istenmeyen yan etkileri oluşturduğu gözlenmiştir [7]. Bu nedenle bu tedavilerin yanı sıra karsinogenezin gelişimini ve ilerlemesini engellemek, geciktirmek veya tersine çevirmek için doğal veya sentetik maddeleri veya bunların kombinasyonlarını kullanan "kemoprevensiyon" adı verilen, kanserin önlenmesine yönelik umut verici bir yaklaşım geliştirilmiştir [11]. Son zamanlarda kemoprevensiyon olarak bilinen yaklaşımda doğal kaynaklı bileşikler ön plana çıkmaktadır. En çok dikkat çeken grup ise flavonoidler olmuştur. Flavonoidler sebzeler, meyveler, tahıllar dahil olmak üzere pek çok bitkisel kaynaklı gıdada bulunan en büyük polifenol grubudur [12]. Flavonoidler sarı renkli olmaları nedeniyle Latince sarı renkli anlamındaki 'flavus' kelimesinden türetilerek bu adı alan sekonder metabolit grubudur. Flavonoidlerin bitkilerde temel görevi savunmadır. Bunun yanı sıra çiçeklerin renklerinin oluşumundan ve kokularından sorumludurlar. Bu bileşikler bitkiyi stres koşullarından ve istenmeyen UV (Ultraviyole) ışınlarından korurlar ve böyle durumlarda miktarlarında belirgin artış gözlenir. Flavonoidlerin bitkilerdeki konsantrasyonu ve kompozisyonu bitkinin farklı kısımlarına bağlı olarak değişir. Yaprak ve meyve kabukları stres koşullarına artan duyarlılıkları nedeniyle flavonoid açısından zengin kısımlardır. Flavonoidler altı üyeli heterosiklik bir piran halkasının üyesi olan ve üç karbonlu bir köprüyle bağlanan iki aromatik halkadan oluşmaktadır [7]. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, flavonoidlerin çeşitli hastalıkları önlemek için çok etkili olduğunu göstermiştir. Bu hastalıklardan en önemlilerinden biri de kanserdir [13]. Reaktif oksijen türleri (ROS) kanserin ortaya çıkmasında ve ilerlemesinde önemli roller oynar [14]. Flavonoidlerin, ROS ve çeşitli serbest radikaller de dahil olmak üzere, çoğu oksitleyici molekül tipini son derece etkili bir şekilde süpürdükları yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Flavonoidler kanserojenlerin biyoaktivasyonu üzerinde de etki göstermektedir. Kersetin, kemferol, naringin, galangin ve apigenin gibi flavonoidlerin, CYP1A (Sitokrom P) ve CYP3A4 (Sitokrom 3A4) enzim ailelerine ait sitokrom P450 enzimlerini inhibe ettikleri bildirilmiştir. Bu enzimler, polisiklik hidrokarbonlar ve heterosiklik aminler gibi bir dizi insan kanserojeninin aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır [15]. Ayrıca flavonoid kaynaklı otofaji, tümör tedavisinde flavonoidlerin temel etki mekanizması olarak ön görülmektedir [16]. Bunlara ek olarak flavonoidler epitelyal-mezenkimal geçişi düzenleyerek kanser hücrelerinin metastatik olarak yayılması, göçü ve istilası üzerinde inhibitör etkilere de sahiptir [17].

Bu derlemede, flavonoidlerin antikanser etki mekanizmaları ve akciğer kanseri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ayrıca flavonoidlerin tedavide ve kanserin yayılımındaki rolü, konuyla ilgili yapılmış *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışma bulguları ışığında değerlendirilmiştir.

***In Vitro* Çalışmalar**

Chang ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yapılan bir çalışmada, naringenin A549 (Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı) hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. 24 ve 48 saatlik naringenin (0-300 µM) tedavisine yanıt olarak A549 hücre proliferasyonunda büyük oranda olumlu değişiklik gözlemlenmiştir. Araştırmacılar naringenin varlığında A549 hücrelerinde doz bağımlı migrasyon inhibisyonunu incelemek için iyileşme ve kuyucuk içi migrasyon analizleri yapmıştır. Bunlara ek olarak zimografi analizi de yapılmıştır. Naringenin matris metalloproteinaz (MMP)-2 ve -9 aktivitelerini ve protein kinaz B aktivitelerini doz bağımlı olarak inhibe etmiştir. Sonuç olarak naringenin, akciğer kanseri A549 hücrelerinin migrasyonunu inhibe ederek, protein kinaz B, MMP-2 ve -9 aktivitelerini azaltarak antikanser etki gösterdiği tespit edilmiştir [18].

2017 yılında yapılan bir çalışmada araştırmacılar hesperidin A549 hücre hatlarında, apoptoz ve hücre canlılığı üzerindeki etkilerini araştırmıştır. A549 ve insan normal akciğer epitelyal BEAS-2B hücre hatlarında hesperidin'in etkilerini incelemek için araştırmacılar MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) ve akış sitometri yöntemlerini kullanmışlardır. 72 saat boyunca 50, 75, 100 ve 125 µg/ml konsantrasyonlarda hesperidin kullanılan A549 hücreleri morfolojik olarak değişiklik göstermiştir ve apoptoz indüklenmiştir. A549 hücrelerinin canlılığı azalmıştır. Hesperidin BEAS-2B hücrelerinde olumsuz bir etkiye sebep olmamıştır ve farklı konsantrasyonlarda hesperidin ile tedavi edilen hücrelerin canlılığı kontrol grubuna kıyasla zaman ve doza bağlı olarak inhibe olmuştur. Apoptotik yolda yer alan proteinlerin ekspresyonu Western Blot analizi kullanılarak belirlenmiştir. Hesperidin, B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) ve Bcl protein düzeylerini down regüle etmiştir ve bu şekilde A549 hücre apoptozunu indüklemiştir. Bu flavonoidin hücre döngüsü üzerine olan etkisini incelemek amacıyla de akış sitometrisi yöntemi kullanılmıştır. A549 hücrelerinde p21 ve p53 ekspresyonu artarak ve siklin D1 ekspresyonu azalarak hücre döngüsü G0/G1 fazında durmuştur. Sonuç olarak hesperidin, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisinde potansiyel bir ilaç etken maddesi olarak geliştirilebileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır [19].

Kemferol (K), küçük boyutlu altın nano kümeleriyle (AuNC) konjuge edilmiş olarak bilinen bir antikanser ilaçtır. 2019 yılında yapılan bir çalışmada araştırmacılar tarafından K-AuNC'ler sentezlenmiş ve antikanser etkisi A549 akciğer kanseri hücre hatları üzerinde test edilmiştir. K-AuNC 12.5 µg/ml konsantrasyonda kanser hücrelerinin çekirdeklerinde hasar meydana getirmiştir. Tedavi edilmemiş hücrelerin morfolojisi sağlam ve düzenli kalırken, K-AuNC'lerle tedavi edilen akciğer kanseri hücreleri çekirdeklerinde farklı kırılmalar meydana gelmiştir. Bu durum hücrelerde apoptoz meydana geldiğini göstermiştir. Ayrıca K-AuNC'lerin kanser hücrelerinin çoğalmasında üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla koloni oluşturma testi uygulanmıştır. 24 saat boyunca hiçbir tedavi uygulanmayan ve K-AuNC uygulanan A549 hücre hatları karşılaştırıldığında, K-AuNC uygulanan hücrelerde ciddi bir oranda daha az koloni oluşmuştur. Bu sonuçlar da kemferolün akciğer kanseri tedavisinde olumlu sonuçlar meydana getirebileceğini göstermiştir [20].

2020 yılında yapılan bir çalışmada araştırmacılar mirisetinin radyorezistan akciğer kanseri hücrelerinin (A549-IR) invazyonu ve de göçü üzerindeki etkisini incelemişlerdir. A549 veya A549-IR hücrelerinin canlılığı üzerine test edilen flavonoidlerin etkisini incelemek için MTT testi yapılmıştır. MTT testi için hücreler (4 x 10³ hücre/kuyu) 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş ve her bir kuyucuğa 20 µl (5 mg/ml) MTT çözeltisi eklenmiş ve ölçüm yapılmıştır. Ayrıca hücrelerde yara kapanma yüzdesine de bakılmıştır. Araştırmacılar flavonoidlerin antikanser aktivitesinin moleküler mekanizmasını Western Blot analizi ile belirlemişlerdir. Birincil antikorlar, deneyler için 1:1.000 oranında seyreltilmiştir. Isıya dayanıklı protein (Heat-resistant protein, HRP)-konjuge anti-tavşan veya anti-fare IgG, 1:5.000 seyreltmede kullanılmıştır. 12 Gy ile irradie edilmiş A549 hücrelerinin A549 hücrelerine kıyasla daha invaziv özelliklere sahip olduğu bulunmuştur. A549-IR hücrelerinde artan bir göç potansiyeli görülmüştür. A549-IR hücrelerinin göç özelliklerini anlamak için transkriptom analizi yapılmıştır. A549-IR hücreleri 199 up regüle ve 222 down regüle olmuş gen dahil olmak üzere değişmiş bir global transkripsiyon profili sergilemiştir A549-IR hücrelerinin, MMP-2 protein seviyelerinde ve gen

ekspresyonunda artış olmuştur. Dolayısıyla irradiye etmenin epitelyal-mezenkimal geçiş özelliklerini teşvik ederek A549 hücrelerinin invazyon ve göç kabiliyetini artırabileceği sonucuna varılmıştır. Mirisetinle tedavi edilen A549-IR hücrelerinde yoğun sitotoksiste gözlenmiştir (%100'e yakın, $p < 0.05$). Ayrıca, Fokal adezyon kinaz (FAK)- Ekstraselüler sinyal-Regüle Kinaz (ERK) sinyalinin mirisetin tarafından inhibisyonunun aktin dinamikleri üzerinde bir etkisi olup olmadığını doğrulamak için aktin polimerizasyon deneyi yapılmıştır. A549-IR hücrelerinde mirisetin maruziyeti üzerine F-aktin/G-aktin oranı azalmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, mirisetinin FAK-ERK sinyal yolunun inhibisyonu yoluyla MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunu baskılayarak radyorezistan akciğer kanseri hücrelerinin (A549-IR) invazyonunu ve göçünü inhibe edebileceğine dair deneysel kanıtlar sunmuştur [21].

Wei ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yapılan bir çalışmada sisplatinin antikanser aktivitesini güçlendirmek amacı ile histon deasetilaz inhibisyonunu ve apoptotik ve hücre döngüsü düzenleyici genlerin, seçilmiş flavonoidler ile oluşan modülasyonunu incelemiştir. Sisplatin ve çalışma için seçilmiş olan flavonoidler kombine şekilde NSCLC (A549, H460 ve H1299) insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hatlarında incelenmiştir. Bu çalışmada hücre canlılıkları Sulforhodamine B (SRB) sitotoksiste testi kullanılarak değerlendirilmiştir. 100 µl kültür ortamına her kuyucuğa 5×10^3 hücre olacak biçimde toplamda 96 adet kuyucuğa ekim yapılmıştır. Daha sonra bir gece boyunca hücreler inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemin ardından kanser hücrelerine sisplatin (0.05–50 µM, 1:1), SAHA (Vorinostat/HDAC inhibitörü, 0.05–10 µM, 1:1), apigenin (0.1–50 µM, 1:1), sisplatin + apigenin kombinasyonu (sabit ilaç oranında 1:5 A549, H460'ta 1:10 veya H1299'da 1:4) uygulaması yapılmıştır. Bu işlem sonucu Sisplatin-apigenin kombinasyonunun, sırasıyla p21 ve proapoptotik proteini (PUMA) indükleyerek, tek başına sisplatin veya apigenin ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde (0.39 ± 0.08 'lik bir CI (SAHA + sisplatin 1:10 oranında; SAHA ve sisplatinin IC_{50} 'si sırasıyla 0.53 ± 0.11 ve 5.3 ± 0.7 µM'dir) ve 0.47 ± 0.04 'lük bir CI (apigenin + sisplatin 5:1 oranında; apigenin ve sisplatinin IC_{50} 'si sırasıyla 25.4 ± 3.1 ve 5.3 ± 0.7 µM'dir)), daha fazla S fazı uzamasına ve G2/M hücre döngüsü durmasına ve apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir. Apigenin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak histon asetilasyonunu artırmıştır. Buna ek olarak NSCLC hücrelerinde sisplatinin antiproliferatif etkisini de artırmıştır. Bu çalışmada, apigenin'in hücre döngüsü durması ve apoptozu indükleyerek sisplatinin antikanser etkisini güçlendirmek için bir histon deasetilaz inhibitörü olarak işlev gördüğü sonucuna varılmıştır [22].

2021 yılında Kang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, *Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz'dan elde ettikleri total flavonoidlerin (TFTM) küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hatları ve bağışıklık sistemi üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada A549 ve H1299 hücreleri kullanılmış ve 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda TFTM'nin bir günde her iki hücre hattındaki hücrelerinin çoğalması üzerinde oldukça etkili olduğu görülmüştür. Metastazı engellemiş, apoptozu indüklemiştir ve tümör inhibisyon oranını arttırmıştır. Tümör dokularında Ki67 ekspresyonu önemli ölçüde azalmıştır. Çalışma sonucunda TFTM akciğer kanserini önleyici bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu etkisinin siklofosfamidten daha hafif düzeyde tümör büyümesini inhibe edici özelliğinden kaynaklandığı düşünülmüştür [23].

Başka bir çalışmada Xiang-Bo Jia ve arkadaşları *Lotus* yaprağı flavonoidleri (LLF)'ni kullanarak insan akciğer kanseri A549 hücrelerine ve insan küçük hücreli akciğer kanseri hücreleri H446 üzerindeki apoptotik etkilerini incelemişlerdir. Ekstraksiyon için 200 g *Lotus* yaprağı 4 l %70 etanol ile tüketilmiştir. Ekstraksiyon için 3 saat boyunca 60 °C'de bir su banyosunda bekletilmiş ve süzümüştür. Ham ekstre FL-3 makrogözenekli reçine cam kolona tatbik edilmiştir. Reçineden geçen süzüntü atılmış ve reçine renksiz hale gelene kadar %70 etanol ile elüe edilmiştir. Elde edilen süzüntü saflaştırılmış flavonoid tozu elde etmek için dondurularak kurutulmuş ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile flavonoidlerin analizi yapılmıştır. LLF başlıca beş aktif madde içermektedir. Bunlar kersetin, kemferitrin, hiperozit, astragalın ve floridzin olarak tespit edilmiştir. LLF'nin 500 µg/ml'e konsantrasyona kadar normal hücrelere toksik etki göstermediği belirlenmiştir. Buna karşın A549 hücreleri ve H446 hücrelerinin büyümesi ve çoğalması üzerinde inhibe edici etkiler oluşturmuştur. LLF konsantrasyonu arttıkça ve maruziyet süresi uzadıkça daha fazla inhibitör etki görülmüştür. 125, 250 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarda LLF, A549 hücrelerinin canlılığını sırasıyla %21.52, %55.91 ve %83.33 oranında inhibe etmiştir. Ayrıca LLF, A549 hücrelerinde malondialdehit ve ROS seviyelerini artırmış

ve SOD aktivitesini azaltmıştır. 125 µg/ml ve 250 µg/ml konsantrasyonlarda LLF uygulanan A549 hücreleri S fazında kalmış ve G fazına geçememiştir. Sonuçlar, LLF'nin belirli bir konsantrasyona kadar normal hücreler için toksik olmadığını, ancak A549 akciğer kanseri hücrelerinin çoğalmasını engelleyebildiğini göstermiştir. LLF, normal hücreler için güvenli kabul edilen konsantrasyonlarda A549 hücrelerinin apoptozunu indükleyebilmiştir. Ayrıca, LLF'nin ROS/p38 MAPK yoluyla ilgili genleri etkileyebildiği ve böylece A549 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. LLF, kanser hücrelerinin inhibisyonu üzerinde beş ana flavonoidin etkili olabileceği ve bu nedenle, LLF'nin aktif bileşenleri aracılığıyla kanser hücrelerini inhibe edebileceği sonucuna varılmıştır [24].

2020 yılında yapılan bir çalışmada luteolin, kersetin ve apigenin flavonoidlerinin akciğer kanseri hücrelerine karşı Doğal Katil Hücrelerin (Natural Killer, NK) aktivitesi ile perforin ve granülizin salgıları üzerindeki immünomodülatör etkileri incelenmiştir. Akciğer kanseri hücrelerine karşı NK hücre aktivitesi MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlara bakıldığında zaman üç flavonoidin de akciğer kanseri hücrelerine karşı NK hücresi aracılı sitotoksitede önemli bir artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Bu etki doz bağımlı olarak değişim göstermiştir. En yüksek aktivite değerleri 2.5 ve 25 µg/ml konsantrasyonlarda apigenin ve luteolinle (sırasıyla %150 ve %140) görülmüştür. Kersetinde ise maksimum aktivite 50 µg/ml'de tespit edilmiştir. Apigenin ve luteolinle tedavi edilen NK hücreleri aracılı sitotoksitede için sitotoksik granüllerin salgılanması artmış ancak kersetinle tedavi edilenlerde bu etki gözlenmemiştir. Kersetin'in daha farklı mekanizmalarla etki edebileceği düşünülmektedir. Araştırmanın bulguları, her üç flavonoidin de akciğer kanseri tedavisine yönelik NK hücre sitotoksik aktivitesi ve granül salgılayıcı profilleri üzerinde bazı önemli immünomodülatör etkilere sahip olabileceklerini göstermiştir [25].

Padmini Rajendran ve arkadaşları tarafından 2020 yılında Mirisetin ve A549 akciğer kanseri hücreleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Araştırmacılar mirisetinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirmek için MTT testini tercih etmişlerdir. Bu hücrelere farklı konsantrasyonlarda mirisetin uygulanmıştır. Hücreler 6.25; 12.5; 25; 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda mirisetine maruz bırakıldığında hücre büyümesi inhibisyon oranları sırasıyla %7, %20, %31, %43 ve %55'e yükselmiştir. A549 hücreleri üzerindeki anlamlı sitotoksik etkisi sebebiyle, 73 µg/ml olan IC₅₀ konsantrasyonu daha ileri antikanser çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Hücre döngüsünün G0/G1 fazında durması mirisetin uygulanan A549 hücrelerinde, uygulanmamış hücrelere kıyasla daha güçlü bir şekilde görülmüştür. Antikanser molekül adayları olarak test edilen mirisetin, kanser hücreleri ile etkileşime girmiş ve apoptotik hücre ölümünü büyük oranda artırmıştır. Ayrıca, mirisetin uygulanan A549 hücrelerinde ROS miktarında artış olduğu tespit edilmiştir. Bu da mirisetinin A549 hücrelerinde ROS birikimi aracılığıyla apoptozu indüklediğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, mirisetinin A549 akciğer kanseri hücrelerinde hücre döngüsünün ilerlemesini ve ROS'a bağlı mitokondri aracılı ölümleri durdurarak sitotoksik potansiyel sergilediğini ve akciğer kanseri terapötikleri için bir ilaç adayları olarak geliştirilmesinin yararlı olacağını göstermiştir [26].

2022 yılında yapılan bir başka çalışmada *Coreopsis tinctoria* Nutt.'tan elde edilen total flavonoidlerin (CTF) antikanser etkisi araştırılmıştır. CTF'nin bileşimi, ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak analiz edilmiştir. CTF'nin hücre canlılığı üzerindeki etkisini incelemek için CCK-8 (Hücre Sayım Kiti-8) testi yapılmıştır. 37 °C'de 24, 48 ve 72 saat boyunca çeşitli CTF konsantrasyonları (25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 veya 1.000 µg/ml) ile inkübasyona bırakılmıştır. CTF, kontrol grubuyla kıyaslandığında A549 ve H292 hücrelerinin proliferasyonunu zamana ve doza bağlı olarak inhibe etmiştir. Apoptozu tespit etmek için akış sitometrisi kullanılmıştır. 50, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda CTF uygulamasından sonra, A549 hücrelerinin apoptoz oranı; kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 18.87 ± 1.27 (50 µg/ml), 32.57 ± 0.38 (100 µg/ml), 60.17 ± 5.60 (200 µg/ml) 15.7 ± 2.66 (kontrol grubu) olarak ve H292 hücrelerinin apoptoz oranı, hücrelere CTF uygulandığında (25, 50 ve 100 µg/ml) sırasıyla 16.27 ± 0.55 (50 µg/ml), 20.33 ± 0.15 (100 µg/ml), 47.03 ± 0.64 (200 µg/ml) 9.73 ± 2.16 (kontrol grubu) olarak bulunmuştur. CTF'nin A549 ve H292 hücrelerinin apoptozunu doz bağımlı olarak indüklediği anlaşılmıştır. Mito-tracker Red CMXRos kullanılarak CTF varlığında mitokondriyal membran potansiyelinde bir azalma olup olmadığı incelenmiştir. Hücreler, 24 saat boyunca farklı CTF konsantrasyonlarıyla (50, 100, 200 µg/ml) inkübasyona bırakılmış ve mitokondriyal membran potansiyelinde önemli azalmalar meydana gelmiştir. Apoptozla ilişkili proteinlerin

ekspresyonundaki değişiklikleri tespit etmek için Western Blot yöntemi tercih edilmiştir. Bunun sonucunda da apoptozda oldukça etkili oldukları bulunmuştur. Tüm sonuçlar, CTF'nin akciğer kanseri üzerindeki antitümör aktivitesinin PI3K-Akt sinyal yolunun inhibe edilmesi ve mitokondriyal aracılı apoptoz yolunun aktive edilmesiyle ilişkili olabileceğini göstermiştir [27].

Jakimiuk ve arkadaşları tarafından 2024 yılında yapılan bir çalışmada, 37 flavonoidin A375 ve C32 melanom hücre hatları üzerindeki antikanser aktiviteleri incelenmiştir. Bu amaçla, A375 ve C32 melanom hücrelerinde sitotoksik testler, DNA biyosentez inhibisyon seviyeleri ve hücre ölümünde yer alan apoptoz yolları araştırılmıştır. Ek olarak flavonoidlerin antikanser aktivitesinin moleküler mekanizması Western Blot ve immüno Floresan analizleri ile hücrelerin canlılığı MTT kolorimetrik testi ile belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda 6 bileşik (apigenin, luteolin, 5,6-dihidroksiflavon, 7,8-dihidroksiflavon, zapotin, genistein) 6, 25, 12,5, 25, 50, 100 veya 200 µM konsantrasyonlarda hem A375 hem de C32 hücre hatlarında güçlü antikanser aktiviteler göstermiştir. 48 saat sonunda en aktif bileşiğin Zapotin olduğu tespit edilmiştir. 16 bileşik [apigenin 8- C -glukozit (viteksin), apigenin 7- O -glukozit, luteolin 7- O -glukuronit, luteolin 7- O -sambubiozit, 5,7,3'-trihidroksi-4'-asetoksi-flavon-8- C -ksilozit-2''- O -glukozit (sklerantozit A), 5,7,3'-trihidroksi-4'-metoksiflavon-8- C -ksilozit-2''- O -glukozit (sklerantozit B), 5,7-dihidroksi-3'-metoksi-4'-asetoksiflavon-8- C -ksilozit-2''- O -(4''-asetoksi)-glukozit (sklerantozit C), 5,7-dihidroksi-3'-metoksi-4'-asetoksiflavon-8- C -arabinozit-2''- O -(4''-asetoksi)-glukozit (sklerantozit D), kemferol 3- O -glukuronid, kemferol 3- O -galaktozit (hiperozit), ikariin, kersetin 3- O -glukuronit, kersetin 3- O -rutinozit-7- O -glukozit, hesperetin 7- O -rutinozit (hesperidin), hesperetin 7- O -neohesperidozit (neohesperidin), daidzein] ise 200 µM konsantrasyonda bile etkili olmamıştır. Araştırmacılar kanser hücrelerinin canlılığındaki azalmanın hücrelerdeki proliferasyonda azalma sonucunda olabileceğini düşünerek DNA sentezi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Zapotin'e maruz kalan hücrelerdeki DNA sentezi hızının ciddi oranda azaldığını belirlemişlerdir. Ayrıca bazı (luteolin, 5,6-dihidroksiflavon, 7,8-dihidroksiflavon, zapotin) flavonoidlerin en düşük konsantrasyonda (25 µM) bile apoptozu ciddi oranda artırdığını belirlemişlerdir [28].

***In Vivo* Çalışmalar**

Shin ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada, sıçanlarda tamoksifenin kersetin ile oral yoldan uygulanmasının tamoksifenin biyoyararlanımı ve antikanser etkisindeki değişimini değerlendirmişlerdir. Çalışmada dişi Sprague-Dawley sıçanları (270-300 g) kullanılmıştır. Hayvanlar 22 ± 2 °C, %50-60 bağıl nem ve 12 saatlik ışık-karanlık döngüsünde tutulan laminar akışlı kafeslerde tutulmuştur. Sıçanlar her biri altı hayvandan oluşan beş gruba ayrılmıştır. 1. Kontrol grubu (oral, 10 mg/kg tamoksifen), 2., 3. ve 4. Gruplar sırasıyla 10 mg/kg tamoksifen ile oral olarak uygulanan 1.5, 7.5 veya 15 mg/kg kersetin ve 5. Grup: İntravenöz 2.0 mg/kg tamoksifen kan örnekleri (0.5 ml) tamoksifen uygulandıktan sonraki 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24 ve 36 saatlerde alınmış, santrifüj edilmiş ve kersetin ile tamoksifenin kan konsantrasyonları yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile incelenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, kersetinin (2.5 ve 7.5 mg/kg) tamoksifenle eş zamanlı uygulanmasının, tamoksifenin emilim sabiti oranını, pik konsantrasyonlarını ve plazma konsantrasyon-zaman eğrisi altındaki alanı büyük oranda artırdığını göstermiştir. Sonuçta, kersetin ile birlikte uygulanması sonucunda tamoksifenin biyoyararlanımının artmasının, kersetinin bağırsak emilimini artırıcı ve tamoksifenin ilk geçiş metabolizmasını azaltıcı etkilerinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür [29].

2012 yılında Akciğer kanseri tedavisinde kersetinin etkinliğini değerlendirmek için aktif nanomiseller hazırlanarak farelerde deneysel akciğer kanseri modelinde yapılan bir çalışma tasarlanmıştır. Çalışmada 20-22 gr arasında fareler kullanılmıştır. Fareler mikro izolatör kafeslerde tutulmuş ve yiyecek ve suya kolaylıkla erişimi sağlamıştır. Tümörler, dişi Rag-2M farelerinde alt sırt bölgesine 5×10^6 A549 hücresinin (50 µl) tek bir deri altına enjeksiyonu yolu ile oluşturulmuştur. Tümör boyutu 50-100 mm³'e ulaştığında (tümör hücresi aşılmasından 3 hafta sonra), fareler grup başına altı hayvandan oluşan üç çalışma grubuna bağımsız şekilde ayrılmıştır. Gruplar: (1) tedavi edilmemiş kontrol, (2) per oral kersetin süspansiyonu (3 g/kg) (taşıyıcı = suda %25 etanol) ve (3) per oral nanomisel kersetin (30 mg/kg) uygulanan hayvan. Kersetin dozu, 3 hafta boyunca haftada üç kez (Pazartesi/Çarşamba/Cuma) 30 mg/kg olarak belirlenmiştir. Spesifik olarak, tümör aşılmasından

10 hafta sonra tümör büyümesi kersetin süspansiyonu için %83 ve nanomiseller formülasyon için %48 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, kersetinin anti-tümör aktivitesinin nanomiseller olarak uygulandığında kontrol ve kersetin süspansiyonuna kıyasla önemli ölçüde arttığını göstermiştir [30].

Majumdar ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapılan bir çalışmada kemoprevansiyonda suda çözünür polimer kapsüllü Nano-Luteolin'in etkinliği *in vivo* olarak incelenmiştir. Çalışmada 4 ila 6 haftalık (~20 g) yirmi sekiz fare (atimik *nu/nu*, Harlan Sprague Dawley) kullanılmıştır. Hayvanlar rastgele dört gruba ayrılmıştır. Farelere 7 gün boyunca her iki günde bir kontrol (Fosfat tamponu, n=7), polimer (n=7), luteolin (3.3 mg/kg vücut ağırlığı; n=7) veya Nano-Luteolin (3.3 mg/kg vücut ağırlığı; n=7) intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Daha sonra farelere subkutan enjeksiyonla 2.5×10^6 Tu212 hücreleri aşılanmıştır. Belirli günlerde tümör boyutları ölçülmüş ve hacimleri hesaplanmıştır. Sonuç olarak tümör hacmindeki fark Nano-Luteolin grubu ile luteolin grubu arasında anlamlı bir seviyeye gelmiştir. Nanopartiküllerle tedavi ile tümör büyümesinde kontrol grubuna göre iyi bir inhibisyon elde edilmiştir. Nano-Luteolin'in etkinliğinin luteolin'den daha güçlü olduğu anlaşılmıştır. Yapılan aşılardan 22 gün sonra kontrol farelerindeki tümör hacmi 886 mm³, Nano-Luteolin tedavi grubunda ise 641 mm³ olarak ölçülmüştür. Bu çalışma, Nano-Luteolin ile tedavi edilen grubun, kontrol grubuna oranla zamanla tümör büyümesi üzerinde Luteolin grubuna göre belirgin bir inhibitör etkiye sahip olduğunu ispat etmiştir [31].

2017 yılında yapılan bir çalışmada araştırmacılar Deguelinin akciğer kanserinde *in vivo* antitümör etkilerini incelemiştir [32]. Deguelin kanser hücrelerinde DNA onarım gen ekspresyonunun inhibisyonu yoluyla DNA hasarını indüklemektedir [33]. Deneyde Otuz altı haftalık erkek atimik BALB/c *nu/nu* fareleri kullanılmıştır. H460 hücreleri (1×10^7 hücre/fare) BALB/c *nu/nu* farelerine deri altından uygulanmıştır. Tümör hacmi 200 mm³'e yaklaştığında, deguelin tedavisi başlatılmıştır. Tümörlü hayvanlar rastgele üç gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan grup I, yalnızca taşıyıcı (%1 DMSO) ile tedavi edilen kontrol grubu, grup II ve grup III deguelin (1 mg/kg ve 4 mg/kg) uygulanan grup olarak bölünmüştür. Fareler aşılandıktan bir ay sonra ötenazi edilmiştir ve tümör hacimleri ölçülmüştür. Taşıyıcı kontrol grubundaki tümör boyutu, hücre aşılmasından sonraki 14. günle karşılaştırıldığında 4 haftalık bir süre boyunca dört kata kadar artmıştır. Deguelin (1 ve 4 mg/kg) tedavisi her 3 günde bir yapılmış ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tümör ağırlığında bir azalma meydana geldiği bulunmuştur [32]. Kısacası flavonoit ailesine ait bir rotenoid olan deguelinin, deneysel akciğer kanseri modelinde tümör çokluğunu, hacmini ve yükünü tespit edilebilir bir toksisite olmaksızın istatistiksel olarak önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir [34].

2019 yılında yapılan bir çalışmada Viteksin'in farelerde insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri A549 hücresi enjekte edilerek oluşturulan tümörler üzerine etkileri incelenmiştir. Deneyde 5-6 haftalık, 15 erkek BALB/c *nu/nu* fare kullanılmıştır. Farelerin sırtlarının yan taraflarına deri altı olarak 2×10^6 A549 hücresi enjekte edilmiştir. Tümör hacmi her 3 günde bir ölçülmüştür. Tümör boyutu yaklaşık 100 mm³'e ulaştığı zaman fareler beş gruba ayrılmıştır. Farelere sırasıyla 1 mg/kg ve 2 mg/kg viteksin intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Bu tedavi dört hafta boyunca devam etmiştir. Çalışma sonunda farelerdeki tümörler çıkarılarak ölçüm yapılmıştır. Sonuç olarak viteksin tedavisinin akciğerde tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ek olarak tümörlerin ortalama ağırlığı da viteksin tedavisinin ardından önemli ölçüde azalmıştır. Bu bulgular, viteksinin küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde anti-kanser etki potansiyeline sahip olabileceğini düşündürmüştür [35].

Meirong Huo ve arkadaşları 2020 yılında kemoterapi duyarlılığı ve mikroçevre modülasyonu yoluyla etkili anti-tümör tedavisi için dekstran bazlı nanopartiküller (NP) ile silibin (SB) ve paklitakselin (PTX) sıçanlara kombine halde uygulayarak akciğer kanserinde flavonoitlerin etkisini incelemeyi amaçlamışlardır. A549 hücreleri (3×10^6 hücre) 18-22 g ağırlığındaki BALB/c farelerin koltuk altı bölgesindeki derinin altına aşılanmıştır ve daha sonra tümör hacmi kumpas kullanılarak ölçülmüştür. A549 tümörleri taşıyan BalB/c *nu/nu* farelerin tümör büyüklükleri 90-100 mm³ e ulaştığında rastgele beş gruba (grup başına n = 5) ayrılmıştır. Bütün gruplar 12 gün boyunca her 2 günde bir 10 mg/kg SB ve 7 mg/kg PTX, (PTX + SB) NP, SB NP ve PTX NP ile tedavi edilmiştir. Sonrasında fareler ötenazi edilmiştir ve tümörleri çıkarılıp tartılmıştır. Ayrıca tümör inhibisyon oranı hesaplanmıştır. Sonuç olarak PTX ve SB kombine halde verildiğinde sadece PTX verildiği durumdan çok daha etkili bulunmuştur. Tümör oranı da yine kombine halde tedaviden sonra tekli tedaviye göre çok daha düşük bulunmuştur.

SB'nin düşük dozda dekstran NP ile verildiğinde PTX'in *in vivo* gücünü belirgin şekilde duyarlı hale getirdiği ve bu durumun sinerjistik bir antitümoral etkiye neden olduğu düşünülmüştür [36].

Klinik Çalışmalar

Margaret ve arkadaşları 2004 yılında kapsamlı bir diyet antioksidan indeksinin geliştirilmesi ve sigara içen erkeklerde akciğer kanseri riski üzerine etkisi ile ilgili bir kohort çalışması yapmışlardır. Araştırmacılar bir diyet antioksidan indeksi oluşturmuşlardır ve α -tokoferol, β -karoten tüketiminin akciğer kanseri riski üzerindeki etkisini tahmin etmeyi amaçlamışlardır. 14.4 yıl (1985-1999) boyunca toplam 1.787 akciğer kanseri vakası tespit edilmiştir. Gıda tüketim anketi yapılmıştır. Bu ankette çalışmadan önceki yıllar boyunca yaygın olarak kullanılan 276 gıda maddesinin/karışık yemek ve içeceğin olağan tüketim sıklığı ve porsiyon boyutları hakkında sorular deney popülasyonuna yönelmiştir. Porsiyon büyüklüğü tahminine yardımcı olmak için her katılımcıya renkli resimli bir kitapçık verilmiştir. α -karoten, β -karoten, β -kriptoksantin, γ -karoten, lutein + zeaksantin ve likopen; kateşin, epikateşin, kemferol, mirisetin ve kersetin; α -tokoferol, γ -tokoferol, α -tokotrienol ve β -tokotrienol; selenyum ve C vitamini gibi antioksidan içerikli gıdaları popülasyonda sık tüketildiği için çalışmaya dahil edilmiştir. Sigara içen erkekler 5 gruba ayrılıp günlük sırasıyla 6.737; 10.249; 13.642; 19.178 ve 36.005 μ g antioksidan içerikli gıda tüketmeleri sağlanmıştır. Sigara içen erkeklerle yapılan bu prospektif kohort çalışmasında, karotenoitler, flavonoitler, tokoferoller, tokotrienoller, selenyum ve C vitamininin kombine kullanımını özetleyen kapsamlı bir antioksidan indeksi geliştirilmiştir. En yüksek dozda alımı olan erkeklerin anlamlı bir antioksidan indeksi olduğunu tespit etmişlerdir. Akciğer kanseri riski, en düşük antioksidan indeksine sahip olan gruba göre çok daha düşük bulunmuştur. Ayrıca, prooksidan olduğu varsayılan bir gıda maddesi olan hem demirini yüksek miktarlarda tüketen erkekler arasında, antioksidan indeksinin en yüksek olduğu kişilerde akciğer kanseri riski, en düşük olana kıyasla yüzde 25-30 daha düşük bulunmuştur [37].

Yan Cui ve arkadaşları 2008 yılında diyetle alınan flavonoitlerin akciğer kanseri üzerindeki etkisini vaka kontrol çalışması ile değerlendirmişlerdir. Yaygın olarak tüketilen flavonoit bileşikleriyle akciğer kanseri arasındaki ilişkileri araştırmak amacıyla, 611 akciğer kanseri hastası, 601 üst aerodijestif sistem kanseri hastası ve 1040 kanser olmayan kişi çalışmaya dahil edilmiştir. Akciğer kanseri ile epikateşin tüketiminin ters orantılı ilişki gösterdiği, sigara içmeyenlerde akciğer kanseri ile epikateşin, kateşin, kersetin ve kemferol tüketimi arasında az düzeyde ilişki olduğu bulunmuştur. Ek olarak, kategorik analizde sigara içenler arasında hesperidin tüketiminin akciğer kanseri gelişimiyle doğru orantılı bir ilişki içinde olduğuna dair bazı kanıtlar olduğu ama bunların yeterli olmadığı ifade edilmiştir. Akciğer kanseri ile sebze tüketimi arasında ters orantılı bir ilişki bulunmuştur. Eldeki bulunmuş olan tutarsız sonuçlar göz önüne alındığında, şarap tüketimi ile akciğer kanseri riski arasındaki ilişki üzerine daha fazla araştırma yapılması gerektiği belirtilmiştir. Buna ek olarak meyve tüketimi, sigara içme durumuna bakılmaksızın akciğer kanseriyle ilişkilendirilememiştir [38].

Pagona Lagiou ve arkadaşları 2009 yılında akciğer kanseri riskiyle ilişkili flavonoit alımı hakkında Yunanistan'daki kadınlar arasında vaka kontrol çalışması yapmışlardır. Bu amaçla kadınlar arasında yapılan bir vaka kontrol çalışmasından elde edilen veriler ile Yunan diyetinde nispeten yaygın olan üç flavonoit sınıfının (flavanonlar, flavan-3-oller ve flavonoller) akciğer kanser etiolojisindeki rolü değerlendirilmiştir. Çalışma popülasyonu akciğer kanseri olan 154 kadın (vaka) ve ortopedik rahatsızlıkları olan 145 kadın (kontrol) hastadan oluşmaktadır. Vaka grubuna 74'ü adenokarsinom, 24'ü skuamöz hücreli karsinom, 21'i küçük hücreli karsinom ve 13 büyük hücreli karsinomlu kadın kanser hastası alınmıştır. Bu kadınlar kanser tiplerine göre sırasıyla 21.6; 28.3; 32.5 ve 37.3 mg/gün flavonoit almışlardır. Flavonoit alımları Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı veri tabanı kullanılarak hesaplanmıştır. Flavonlar, antosiyanidinler veya izoflavonlar Yunan diyetinde bol miktarda bulunmadığı için çalışmaya dahil edilmemiştir. Flavonoit kategorilerinden herhangi birinin alımının akciğer kanseri riskini azalttığına dair hiçbir ilişki bulunmamıştır; tam tersi flavonoller için beklenmedik bir pozitif ilişki bulunmuştur. Dolayısıyla, çalışma flavanonların, flavan-3-ollerin veya flavonollerin akciğer kanseri riski üzerinde koruyucu bir etkisi olduğunu göstermemektedir ve sebze ve meyvelerin bu kanser riskine karşı koruyucu etkisinden sorumlu faktörlerin bu flavonoit kategorilerine ait olma ihtimalinin düşük olduğunu göstermiştir [39].

Krista Yorita Christensen ve arkadaşları 2012 yılında Montreal, Kanada'da (1061 hasta ve 1425 kontrol) popülasyona dayalı bir vaka kontrol çalışmasında 5 flavonoit alt sınıfının (antosiyanidinler, flavan-3-oller, flavonlar, flavonoller ve flavanonlar) alımı ile akciğer kanseri riski ilişkilerini incelemişlerdir. Çalışmada, yiyecek ve içeceklerle alınmış olan flavonoitlerin antioksidan, antienflamatuvar, antimutajenik ve antiproliferatif etkileri sayesinde kanser riskini azaltabileceği hipotezi öne sürülmüştür. Çalışma dozu 5 alt sınıfın tamamının alımı toplanarak hesaplanan toplam flavonoit alımı, vaka grubu için ortalama 108.8 (53.7–434.2) mg/gün ve kontrol grubu için ortalama 117.7 (69.6–340.6) mg/gün olarak hesaplanmıştır. Yaşları 35 ve 75 arasında değişen erkek ve kadın Kanadalıların flavonoit alımları, çalışmadan 2 yıl önce diyeti değerlendiren bir gıda sıklığı anketi yapılarak belirlenmiştir. Popülasyonun diyetinde karotenoit ve vitamin C kaynakları, meyve, sebze, et, süt ürünleri ve tahıl ürünleri dahil olmak üzere 42 gıda maddesi kullanılmıştır. Polifenoller farklı yiyecek ve içeceklerden farklı şekilde emildiği için bu kaynaklardan gelen flavonoitler ayrı ayrı değerlendirilmiştir. İçecek alımı Besin Tüketim Sıklığı anketi ile değerlendirildiğinden ve polifenoller farklı yiyecek ve içeceklerden farklı şekilde emilebildiğinden, yiyecek ve içecek kaynaklarından (ör. çay, şarap, bira) gelen flavonoitler (flavon ve flavanon gibi) için ayrı analizler gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya katılan hastalarda akciğer kanserlerinin çoğunluğu adenokarsinom veya skuamöz hücreli karsinom olarak teşhis edilmiştir. Toplam flavonoit alımına en büyük katkıyı siyah çay tüketimi sağlamıştır. Sonuç olarak C vitamini ile toplam flavon ve flavanon alımının yanı sıra karotenoit beta-kriptoksantin ile aynı flavonoit sınıfları arasında orta derecede korelasyon bulunmuştur. Yalnızca flavonlar ve flavanonlar için en yüksek dozda ve en düşük dozda alımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ters orantı gözlemlenmişlerdir. Çalışmada antosiyandinler ve flavonoller için, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir. Toplam flavonoitler için de istatistiksel olarak anlamlı bir ters orantılı ilişki olduğu anlaşılmıştır. Araştırmacılar yalnızca içecek kaynaklarından alınan flavonoitleri incelendiğinde (flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavan-3-oller (kateşinler olarak da anılır), antosiyanidinler ve izoflavonlar) herhangi biri için ilişkiye ait kanıt bulamamışlardır. Ama gıdalardan elde edilen flavonoitler için, antosiyanidinler dışındaki tüm flavonoitlerde istatistiksel olarak anlamlı ters orantılı ilişkiler gözlemlenmiştir. Flavonlar için, skuamöz hücreli karsinom riskinin, en düşük dozda alıma göre büyük ölçüde azaldığı, küçük hücreli karsinom ve adenokarsinom için ilişkilerin sıfıra daha yakın olduğu bulunmuştur. Benzer olarak flavanon alımı ile skuamöz hücreli karsinom arasında ters orantılı ilişkili bulunmuş ancak adenokarsinom veya küçük hücreli karsinom arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir. Araştırmacılar bu araştırmalardan sonuç olarak vaka kontrol çalışmasından elde edilen veriler ışığında içeceklerden değil de gıdalardan düşük flavonoit alımının genel olarak daha yüksek akciğer kanseri riski ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir [40].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Kanser ülkemizde ve dünyada oldukça yaygın görülen hastalıkların başında gelmektedir. Akciğer kanseri dünyada en sık görülen kanser türlerinden biridir. Bunun yanı sıra bu kansere yakalanan hastaların ölüm oranları da oldukça yüksektir. Bu nedenle bu alanda çalışmalara yoğunluk verilmiştir. Bu hastalık doku ve organlardaki hücrelerin kontrolsüz büyümesi, bölünmesi ve istilasıyla meydana gelmektedir. Kanser hücreleri, kanserin ayırt edici özellikleri olarak bilinen yeni hücresel özelliklerin ortaya çıkmasına neden olan önemli biyolojik değişikliklere uğramaktadırlar [7]. Bu durumun erken evrede kolayca tespit edilememesi sonucunda önce doku daha sonra da organlar zarar görmeye ve metastaz oluşmaya başlamaktadır. Günümüzde kanser hastaları için cerrahi yöntemler, radyasyon terapisi, immünoterapi, kemoterapi, palyatif tedavi, kök hücre, geleneksel ve tamamlayıcı tıp tekniklerini içeren pek çok tedavi seçeneği bulunmaktadır [10]. Ancak bu yöntemlerle de kanser tamamen iyileştirilemeyebilir ve bunun yanı sıra beklenmedik ve istenmeyen etkiler oluşabilir [7]. Bu sebeple kanser tedavisi için sürekli yeni yöntem ve yeni ilaç molekül adaylarının keşfine yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Gözlemsel kohort ve vaka kontrol çalışmalarının meta analizleri, diyetle alınan yüksek flavonoit alımının akciğer, meme, yumurtalık, özofagus ve kolorektal kanser riskini azaltabileceği ve tedaviye destek olabileceğini göstermektedir. Bu derlemede, flavonoitler üzerinde yapılan bilimsel çalışma sayısının daha çok olması ve dünyada en çok görülen ilk üç kanser arasında olması sebebiyle bu

sekonder bileşik grubunun akciğer kanserindeki etkinliği üzerindeki çalışmalar incelenmiş ve rapor halinde sunulmuştur. Literatür bulguları flavonoidlerin antikanser etki mekanizmaları içinde antioksidan, antienflamatuar, antiproliferatif aktiviteler, biyoaktifleştirici enzimlerin inhibisyonu ve detoksifiye edici enzimlerin indüksiyonu dahil olmak üzere birçok mekanizmanın yer aldığını göstermektedir. Bunun yanı sıra flavonoidler seçici olarak kanser hücrelerini apoptoza teşvik ederken ve yok ederken normal sağlıklı hücrelere zarar vermemekte, seçici etki göstermektedirler. Bu durum oldukça önemlidir. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda kemoterapi ilaçları ve farklı flavonoidlerin kombinasyonu ile yapılan tedavilerde oldukça umut vaat eden sonuçlara ulaşılmıştır. Bu sonuçlar da araştırmacıları yeni çalışmalar yapmaya teşvik etmiştir. Bunun yanı sıra bazı flavonoidler çeşitli formlara getirilerek (mikro ve nano boyutlarda) hastalara uygulanmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu bulgular flavonoidlerin daha etkili olabilmesi için farklı formlara getirilebilme imkânı olduğunu da göstermektedir. Fakat oldukça potent bulunan bu flavonoid alt sınıflarının ilaç haline getirilmesine yönelik çok fazla sayıda çalışma yapılmamıştır. Önemle vurgulanması gereken diğer bir konu ise bu etkilerin genellikle insanlarda beslenme yoluyla alınabilen flavonoid miktarlarından çok daha yüksek konsantrasyonlarda alınması durumunda ortaya çıkabileceğidir.

Bu derlemede, flavonoidlerin akciğer kanserindeki etkinliklerini tespit edebilmek için yapılan *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmalar incelenmiş ve literatür bulgularının ışığında, flavonoidlerin sınıfları ve antikanser etki mekanizmaları ile flavonoidlerle kombine edilen tedavilerin akciğer kanserindeki etkinliklerine dair klinik öncesi çalışma sonuçları konunun daha iyi anlaşılabilmesi için Tablolar halinde sunulmuştur (Tablo 1 ve Tablo 2).

Tablo 1. Flavonoidlerin sınıfları ve antikanser etki mekanizmaları [41,42]

Flavonoid Sınıfı	Flavonoidler	Elde Edildikleri Kaynak	Etki
Flavanonlar	Hesperitin, Naringenin	Narenciye	Hücrelerde proliferasyonun inhibisyonu ve apoptozisin aktivasyonu
İzoflavonlar	Daidzein, Genistein	Soya ürünleri	Apoptozun indüklenmesi, tirozin kinaz inhibitörlerinin hedef olarak etkilenmesi
Flavonlar	Apigenin, Luteolin	Maydanoz	Antienflamatuar, apoptozun aktive edilmesi
Antosiyanidinler	Delfinidin Pelargonidin	Siyah meyveler	Antienflamatuar etki, apoptozun aktivasyonu
Flavonoller	Kemferol, Kersetin	Brüksel lahanası ve fasulye	Antienflamatuar, antiproliferatif etki

Flavonoidlerin prelinik çalışmalarda akciğer karsinogenezini inhibe ettiği ve sinyal yollarını hedefleme kapasitesine sahip olduğu anlaşılınca beraber, çok daha fazla klinik çalışmanın yapılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Özellikle terapötik ajanların ve flavonoidlerin farklı kombine senaryolarını kullanmak, aynı zamanda kemoterapötiklerin dozunu azaltarak toksisitede azalma sağlamak ve çoklu sinyal yollarını hedefleyerek maksimum etkinlik sağlamak akciğer kanseri hastaları için de ilerleyen dönemde umut vaat edecek tedavi seçeneklerini oluşturabilecektir.

Flavonoidlerin hücrelerdeki etki mekanizmalarını nasıl gerçekleştirdiklerine dair ayrıntıları keşfetmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulsa da, artan miktarda kanıt, flavonoidlerin anti-kanser biyoaktif bileşikler olarak potansiyel kullanımını güçlü bir şekilde göstermektedir.

Tablo 2. Flavonoitlerle kombine edilen tedavilerin akciğer kanserindeki etkinliklerine dair klinik öncesi çalışma sonuçları

Flavonoitler	Uygulanan Tedavi	Hücre hatları	Etki	
Fisetin	Paklitaksel	A549 hücreleri	Kombinasyon tedavisinin sinerjik etki göstermesi	41
Genistein	Radyoterapi	A549 hücreleri	Apoptozun uyarılması ve plazmik Bcl-xL seviyelerinin azaltılması	41
Epigallokateşin gallat	Sisplatin	A549 ve H1299 hücreleri	Sisplatin duyarlılığını artırır	43
Epigallokateşin gallat	Sisplatin	H1299 ve Lu99 hücreleri	AXK ve TYRO3 reseptör tirozin kinazlarının down regülasyonu	44

Sonuç olarak bu konu hakkında *in vitro* çalışmalar *in vivo* ve klinik çalışmalara göre daha yeterli düzeydedir. Daha fazla *in vivo* ve klinik çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Bu kapsamda daha önceden üzerinde çalışılmamış olan flavonoitler üzerine daha güncel ve kapsamlı klinik çalışmalar yapılabilir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: Ö.F.G., D.D.O.; Tasarım: Ö.F.G., D.D.O.; Denetim: Ö.F.G., D.D.O.; Kaynaklar: Ö.F.G., D.D.O.; Malzemeler: Ö.F.G., D.D.O.; Veri Toplama ve/veya İşleme: Ö.F.G., D.D.O.; Analiz ve/veya Yorumlama: Ö.F.G., D.D.O.; Literatür Taraması: Ö.F.G., D.D.O.; Makalenin Yazılması: Ö.F.G., D.D.O.; Kritik İnceleme: Ö.F.G., D.D.O.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

ETİK KURUL ONAYI

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

KAYNAKLAR

1. Debela, D.T., Muzazu, S.G., Heraro, K.D., Ndalama, M.T., Mesele, B.W., Haile, D.C., Kitui, S.H., Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. SAGE Open Medicine, 9, 20503121211034366. [\[CrossRef\]](#)
2. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I., Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 74(3), 229-263. [\[CrossRef\]](#)
3. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 71(3), 209-249. [\[CrossRef\]](#)
4. Yalçın, G.T. (2013). Yüksek Lisans Tezi. Flavonoidlerin Kanser Hücrelerine Etkisi. Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye.
5. Li, G., Ding, K., Qiao, Y., Zhang, L., Zheng, L., Pan, T., Zhang, L. (2020). Flavonoids regulate inflammation and oxidative stress in cancer. Molecules, 25(23), 5628. [\[CrossRef\]](#)
6. Simeone, J.C., Nordstrom, B.L., Patel, K., Klein, A.B. (2019). Treatment patterns and overall survival in metastatic non-small-cell lung cancer in a real-world, US setting. Future Oncology, 15(30), 3491-3502. [\[CrossRef\]](#)
7. Yao, H., Xu, W., Shi, X., Zhang, Z. (2011). Dietary flavonoids as cancer prevention agents. Journal of Environmental Science and Health, Part C, 29(1), 1-31. [\[CrossRef\]](#)




8. Vazhappilly, C.G., Amararathna, M., Cyril, A.C., Linger, R., Matar, R., Merheb, M., Ramadan, W.S., Radhakrishnan, R., Rupasinghe, H.V. (2021). Current methodologies to refine bioavailability, delivery, and therapeutic efficacy of plant flavonoids in cancer treatment. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 94, 108623. [\[CrossRef\]](#)
9. Purut, H.P., Köse, B.G., Akbal, Y., Özdemir, V.A., Çol, B.K. (2022). Kemoterapi Alan Kanser Hastalarında Görülen Semptomlar ve Tamamlayıcı Terapi Uygulamaları Kullanımları. *Sağlık Akademisyenleri Dergisi*, 9(3), 211-219. [\[CrossRef\]](#)
10. Knight, S.R., Shaw, C.A., Pius, R., Drake, T.M., Norman, L., Ademuyiwa, A.O., Fermani, C.G. (2021). Global variation in postoperative mortality and complications after cancer surgery: A multicentre, prospective cohort study in 82 countries. *The Lancet*, 397(10272), 387-397. [\[CrossRef\]](#)
11. Atawodi, S.E., Atawodi, J.C., Idakwo, P., Pfundstein, B., Haubner, R., Wurtele, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., Owen, R.W. (2009). Evaluation of the polyphenol composition and antioxidant activity of African variety of *Dacryodes edulis* (G. Don) HJ Lam fruit. *Journal of Medicinal Food*, 12(6), 1321-1325. [\[CrossRef\]](#)
12. Ponte, L.G.S., Pavan, I.C.B., Mancini, M.C.S., da Silva, L.G.S., Morelli, A.P., Severino, M.B., Bezerra, R.M.N., Simabuco, F.M. (2021). The hallmarks of flavonoids in cancer. *Molecules*, 26(7), 2029. [\[CrossRef\]](#)
13. Forni, C., Rossi, M., Borromeo, I., Feriotto, G., Platamone, G., Tabolacci, C., Mischiati, H., Beninati, S. (2021). Flavonoids: A myth or a reality for cancer therapy? *Molecules*, 26(12), 3583. [\[CrossRef\]](#)
14. Slika, H., Mansour, H., Wehbe, N., Nasser, S.A., Iratni, R., Nasrallah, G., Shaito, A., Ghaddar, T., Kobeissy, F., Eid, A.H. (2022). Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 146, 112442. [\[CrossRef\]](#)
15. Le Marchand, L., Murphy, S.P., Hankin, J.H., Wilkens, L.R., Kolonel, L.N. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(2), 154-160.
16. Pang, X., Zhang, X., Jiang, Y., Su, Q., Li, Q., Li, Z. (2021). Autophagy: Mechanisms and therapeutic potential of flavonoids in cancer. *Biomolecules*, 11(2), 135. [\[CrossRef\]](#)
17. Liskova, A., Koklesova, L., Samec, M., Smejkal, K., Samuel, S.M., Varghese, E., Abotalep, M., Biringer, K., Kudela, E., Danko, J., Şakıbei, M., Kwon, T.K., Büsselberg, B., Kubatka, P. (2020). Flavonoids in cancer metastasis. *Cancers*, 12(6), 1498. [\[CrossRef\]](#)
18. Chang, H.L., Chang, Y.M., Lai, S.C., Chen, K.M., Wang, K.C., Chiu, T.T., Chang, F.H., Hsu, L.S. (2017). Naringenin inhibits migration of lung cancer cells via the inhibition of matrix metalloproteinases-2 and-9. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(2), 739-744. [\[CrossRef\]](#)
19. Xia, R., Sheng, X., Xu, X., Yu, C., Lu, H. (2018). Hesperidin induces apoptosis and G0/G1 arrest in human non-small cell lung cancer A549 cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(1), 464-472. [\[CrossRef\]](#)
20. Govindaraju, S., Roshini, A., Lee, M.H., Yun, K. (2019). Kaempferol conjugated gold nanoclusters enabled efficient for anticancer therapeutics to A549 lung cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 5147-5157. [\[CrossRef\]](#)
21. Kang, H.R., Moon, J.Y., Ediriweera, M.K., Song, Y.W., Cho, M., Kasiviswanathan, D., Cho, S.K. (2020). Dietary flavonoid myricetin inhibits invasion and migration of radioresistant lung cancer cells (A549-IR) by suppressing MMP-2 and MMP-9 expressions through inhibition of the FAK-ERK signaling pathway. *Food Science and Nutrition*, 8(4), 2059-2067. [\[CrossRef\]](#)
22. Yan, W., Wu, T.H., Leung, S.S., To, K.K. (2020). Flavonoids potentiated anticancer activity of cisplatin in non-small cell lung cancer cells *in vitro* by inhibiting histone deacetylases. *Life Sciences*, 258(1), 118211. [\[CrossRef\]](#)
23. Kang, L., Song, Y. G., Fang, X. Y., Zhang, J., Zhang, Y. N., Miao, J. X. (2021). Total flavonoids of *Taraxacum mongolicum* inhibit non-small cell lung cancer by regulating immune function. *Journal of Ethnopharmacology*, 281, 114514. [\[CrossRef\]](#)
24. Jia, X.B., Zhang, Q., Xu, L., Yao, W.J., Wei, L. (2021). Lotus leaf flavonoids induce apoptosis of human lung cancer A549 cells through the ROS/p38 MAPK pathway. *Biological Research*, 54(1), 7. [\[CrossRef\]](#)
25. Oo, A.M., Mohd Adnan, L.H., Nor, N.M., Simbak, N., Ahmad, N.Z., Lwin, O.M. (2021). Immunomodulatory effects of flavonoids: An experimental study on natural-killer-cell-mediated cytotoxicity against lung cancer and cytotoxic granule secretion profile. *Proceedings of Singapore Healthcare*, 30(4), 279-285. [\[CrossRef\]](#)
26. Rajendran, P., Maheshwari, U., Muthukrishnan, A., Muthuswamy, R., Anand, K., Ravindran, B., Dhanaraj, P., Balamuralikrishnan, B., Chang, W., Chung, W.J. (2021). Myricetin: Versatile plant based flavonoid for cancer treatment by inducing cell cycle arrest and ROS-reliant mitochondria-facilitated apoptosis in A549 lung cancer cells and *in silico* prediction. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476(1), 57-68. [\[CrossRef\]](#)

27. Wufuer, Y., Yang, X., Guo, L., Aximujiang, K., Zhong, L., Yunusi, K., Wu, G. (2022). The antitumor effect and mechanism of total flavonoids from *Coreopsis tinctoria* Nutt (snow chrysanthemum) on lung cancer using network pharmacology and molecular docking. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 761785. [\[CrossRef\]](#)
28. Jakimiuk, K., Szoka, Ł., Surazyński, A., Tomczyk, M. (2024). Using flavonoid substitution status to predict anticancer effects in human melanoma cancers: An *in vitro* study. *Cancers*, 16(3), 487. [\[CrossRef\]](#)
29. Shin, S.C., Choi, J.S., Li, X. (2006). Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 313(1-2), 144-149. [\[CrossRef\]](#)
30. Tan, B.J., Liu, Y., Chang, K.L., Lim, B.K., Chiu, G.N. (2012). Perorally active nanomicellar formulation of quercetin in the treatment of lung cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 651-661. [\[CrossRef\]](#)
31. Majumdar, D., Jung, K.H., Zhang, H., Nannapaneni, S., Wang, X., Amin, A.R., Çen, Z., Çen, Z.G., Shin, D.M. (2014). Luteolin nanoparticle in chemoprevention: *In vitro* and *in vivo* anticancer activity. *Cancer Prevention Research*, 7(1), 65-73. [\[CrossRef\]](#)
32. Hsu, Y.C., Chiang, J.H., Yu, C.S., Hsia, T.C., Wu, R.S.C., Lien, J.C., Lai, K.C., Yu, F.S., Chung, J.G. (2017). Antitumor effects of deguelin on H 460 human lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*: Roles of apoptotic cell death and H 460 tumor xenografts model. *Environmental Toxicology*, 32(1), 84-98. [\[CrossRef\]](#)
33. Ji, B.C., Yu, C.C., Yang, S.T., Hsia, T.C., Yang, J.S., Lai, K.C., Ko, Y.C., Lin, J.Y., Lai, K.Y., Chung, J. G. (2012). Induction of DNA damage by deguelin is mediated through reducing DNA repair genes in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells. *Oncology Reports*, 27(4), 959-964. [\[CrossRef\]](#)
34. Lee, H.Y., Oh, S.H., Woo, J.K., Kim, W.Y., Van Pelt, C.S., Price, R.E., Ccody, D., Tran, H., Pezutto, J.M., Moriarty, R.M., Hong, W.K. (2005). Chemopreventive effects of deguelin, a novel Akt inhibitor, on tobacco-induced lung tumorigenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(22), 1695-1699. [\[CrossRef\]](#)
35. Liu, X., Jiang, Q., Liu, H., Luo, S. (2019). Vitexin induces apoptosis through mitochondrial pathway and PI3K/Akt/mTOR signaling in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Biological Research*, 52(1), 1-7. [\[CrossRef\]](#)
36. Huo, M., Wang, H., Zhang, Y., Cai, H., Zhang, P., Li, L., Zhou, J., Yin, T. (2020). Co-delivery of silybin and paclitaxel by dextran-based nanoparticles for effective anti-tumor treatment through chemotherapy sensitization and microenvironment modulation. *Journal of Controlled Release*, 321, 198-210. [\[CrossRef\]](#)
37. Wright, M.E., Mayne, S.T., Stolzenberg-Solomon, R.Z., Li, Z., Pietinen, P., Taylor, P.R., Wirtamo, J., Albanes, D. (2004). Development of a comprehensive dietary antioxidant index and application to lung cancer risk in a cohort of male smokers. *American Journal of Epidemiology*, 160(1), 68-76. [\[CrossRef\]](#)
38. Cui, Y., Morgenstern, H., Greenland, S., Tashkin, D.P., Mao, J.T., Cai, L., DO, W.D., Mack, T.M., Lu, Q.Y., Zhang, Z.F. (2008). Dietary flavonoid intake and lung cancer-A population-based case-control study. *Cancer*, 112(10), 2241-2248. [\[CrossRef\]](#)
39. Lagiou, P., Rossi, M., Lagiou, A., Tzonou, A., La Vecchia, C., Trichopoulos, D. (2008). Flavonoid intake and liver cancer: A case-control study in Greece. *Cancer Causes and Control*, 19(8), 813-818. [\[CrossRef\]](#)
40. Christensen, K.Y., Naidu, A., Parent, M.É., Pintos, J., Abrahamowicz, M., Siemiatycki, J., Koushik, A. (2012). The risk of lung cancer related to dietary intake of flavonoids. *Nutrition and Cancer*, 64(7), 964-974. [\[CrossRef\]](#)
41. Zanoaga, O., Braicu, C., Jurj, A., Rusu, A., Buiga, R., Berindan-Neagoe, I. (2019). Progress in research on the role of flavonoids in lung cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4291. [\[CrossRef\]](#)
42. Li, G., Ding, K., Qiao, Y., Zhang, L., Zheng, L., Pan, T., Zhang, L. (2020). Flavonoids regulate inflammation and oxidative stress in cancer. *Molecules*, 25(23), 5628. [\[CrossRef\]](#)
43. Bhardwaj, V., Mandal, A.K.A. (2019). Next-generation sequencing reveals the role of epigallocatechin-3-gallate in regulating putative novel and known microRNAs which target the MAPK pathway in non-small-cell lung cancer A549 cells. *Molecules*, 24(2), 368. [\[CrossRef\]](#)
44. Wang, H., Bian, S., Yang, C.S. (2011). Green tea polyphenol egcg suppresses lung cancer cell growth through upregulating mir-210 expression caused by stabilizing hif-1alpha. *Carcinogenesis*, 32(12), 1881-1889. [\[CrossRef\]](#)



KOKU BİLEŞENLERİNİN FOTOTOKSİK (FOTOİRİTAN) VE FOTOALERJİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF PHOTOTOXIC (PHOTOIRRITANT) AND PHOTOALLERGIC EFFECTS OF FRAGRANCE MATERIALS

Gökçe DURMUŞ^{1,2} , İrem ÖZKAN^{1,3} , Özge CEMİLOĞLU ÜLKER^{4*} 

¹Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, 06110, Ankara, Türkiye

²Kastamonu Üniversitesi, İnebolu Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Programı, 37500, Kastamonu, Türkiye

³T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, 06520, Ankara, Türkiye

⁴Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, 06560, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Koku bileşenleri günümüzde parfümlerde, ev temizliği ürünlerinde, kişisel bakım ve kozmetik ürünlerinde sıklıkla yer almaktadır. Amaçları güzel koku vermek veya kötü kokuları maskeleyen bu bileşenlerin, güneş ışığına maruziyet sonucu fototoksikite ve fotoalerji gibi çeşitli olumsuz reaksiyonlara sebep olduğu görülebilmektedir. Bu sebeple formülasyonlardaki diğer maddelerde olduğu gibi koku bileşenlerinde de güvenilirlik değerlendirmesi oldukça önem arz etmektedir. Çeşitli test ve yöntemlerle koku bileşenlerinin güvenilirlik değerlendirmesi yapılmakta, ilgili kuruluşlar tarafından incelenmekte ve kullanım onayı verilmektedir. Bu derlemede koku bileşenlerinin risk değerlendirme prosedürleri, güneş ışığına maruziyet sonucu meydana gelen fototoksikite (fotoiritasyon) ve fotoalerji reaksiyonları ve mekanizmaları, bu olumsuz reaksiyonları değerlendirmek için kullanılan test metodları özetlenmiştir. Ayrıca formülasyonlarda en sık kullanılan koku bileşenlerinin güvenilirlik değerlendirmeleri incelenmiş, fototoksikite ve fotoalerji açısından sonuçlarına değinilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Fototoksikite ve fotoalerji reaksiyonlarına neden olan bileşenlerin önceden tespit edilmesi, üretim süreçlerinde ve ürün geliştirme aşamalarında oldukça önemlidir ayrıca bu tip bileşenler hakkında bilgi sahibi olmak, tüketicilerin cilt sağlığını korumak için bilinçli ürün seçimine olanak sağlar.

Anahtar Kelimeler: Fotoalerji, fototoksikite, güvenilirlik değerlendirmesi, koku bileşenleri

ABSTRACT

Objective: Fragrance components are often included in perfumes, household cleaning products, personal care and cosmetic products today. There are some studies that showed these components led to phototoxicity and photoallergy as a result of sunlight exposure. For this reason, the safety assessment of fragrance components is of great importance. The safety evaluation of the fragrance components is carried out by various tests and methods, they are examined by the relevant organizations. In this review, the risk assessment processes of fragrance components, phototoxicity (photoirritation) and photoallergy reactions, mechanisms caused by sunlight exposure and test methods used to evaluate these negative reactions are summarized. In addition, the safety

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Özge Cemiloğlu Ülker
e-posta / e-mail: oulker@pharmacy.ankara.edu.tr, Tel. / Phone: +905053952958

Gönderilme / Submitted : 16.07.2024

Kabul / Accepted : 16.10.2024

Yayınlanma / Published : 20.01.2025

evaluations of the fragrance components most commonly used in formulations were examined, and the results in terms of phototoxicity and photoallergenicity were also mentioned.

Result and Discussion: *The preliminary identification of the components that cause phototoxicity and photoallergy reactions is very important in the production processes and product development stages. Also, having information about these types of components allows consumers to make informed product choices to protect skin health.*

Keywords: *Fragrance materials, phototoxicity, photoallergy, safety assessment*

GİRİŞ

Koku bileşenleri, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerin, farmasötik ürünlerin, ev temizlik ürünlerin içeriğine yaygın olarak giren kimyasal maddelerdir. Koku bileşenleri, tek başına ya da karışım olarak farklı ve güzel koku seçenekleri sunarak ürünlerin cazip hale gelmesini sağlarlar [1]. Genellikle hammaddeden gelen hoş olmayan kokuyu maskeleyerek için kullanılırlar [2].

Kokuların çok çeşitli ürünlerle karşımıza çıktığını söylemek mümkündür. Tablo 1’de gruplandırdığımız ürünlerden de görüldüğü üzere bireyler günlük hayatı boyunca sıklıkla koku bileşenlerine maruz kalmaktadır. Bu maruziyet yoğunluğu koku bileşenlerinde güvenlik değerlendirmelerinin yapılmasının önemini bize göstermektedir [1].

Tablo 1. Koku bileşenlerinin bulunduğu ürünler

Kozmetik ve Kişisel Bakım Ürünleri	Farmasötik Ürünler	Ev Temizlik Ürünleri
Güneş Kremeleri	Aromaterapi Ürünleri	Çamaşır Deterjanları
Parfümler ve deodorantlar	Kremler/Merhemler	Yumuşatıcılar
Nemlendiriciler	Buharlaştırıcı merhemler	Bulaşık deterjanları
Makyaj ürünleri	Pastiller	Oda kokuları
Saç bakım ürünleri		Yüzey temizleyiciler
Sabun ve hijyen ürünleri		
Ağız hijyen ürünleri		
Tıraş ürünleri		
Tırnak bakım ürünleri		

Koku malzemelerinin kullanım oranlarına bakıldığında %60’ının sabun, yumuşatıcı, temizleyici ve deterjanlarda bulunduğu görülmektedir. Koku bileşenlerine maruziyet, sadece içeriğinde bulunduğu ürünler yoluyla değil, kullanımları sonucu su ve kanalizasyon sistemlerine karışması gibi çevresel faktörlerle de olmaktadır [3]. Tüketiciler ise koku bileşenlerine genellikle dermal ve inhalasyon yoluyla, nadir olarak da oral yolla maruz kalırlar [1]. Özellikle ciltle doğrudan temas eden ürünlerin neden oldukları tahriş edici dermatit, diskromi (renk tonu eşitsizliği), alerjik kontakt dermatit ve kokularla ilişkili ışığa duyarlılık (fototoksitesite ve fotoalerji) gibi cilt sorunlarını en aza indirmek önemlidir [3].

Koku Bileşenlerinin Kimyasal Özellikleri

Koku bileşenlerinin kimyasal özelliklerini bilmek, yapılacak güvenlik değerlendirmesinde önemlidir. Kimyasal yapıya göre transdermal emilimini, metabolizmasını ve toksisitesini tahmin etmek kolaylaşır. Örneğin, ester grubu bir koku bileşeninin güvenlik değerlendirilmesinde aynı yapısal sınıftaki mevcut güvenlik verilerine bakarak yorum yapmak mümkün olabilir. Koku malzemeleri çok fazla kimyasal yapı içermesine rağmen Tablo 2’deki gibi temel olarak 23 gruba ayrılabilir [3].

Koku bileşenlerinin birden fazlasının karışım halinde kullanılması da mümkündür. Bilinmeyen veya değişken bir bileşime sahip olan maddeler ve karmaşık reaksiyon ürünleri, (Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological-UVCB) UVCB maddeleri olarak adlandırılmaktadır [4]. Koku bileşenleri için düşündüğümüzde bu karışımlar; uçucu yağlar, bitki özleri ve çeşitli reaksiyon ürünlerinin birleşiminden oluşabilir. UVCB’nin değerlendirilmesi; içerisindeki maddelerin belirlenmesi, bileşenlerin analizleri ve karışımın analizi yapılarak gerçekleştirilmektedir [1].

Tablo 2. Koku bileşenlerinin temel grupları [3]

Kimyasal Grup	Kimyasal Sayısı	Kimyasal Grup	Kimyasal Sayısı
Esterler	707	Piranlar	27
Alkoller	302	Miscellaneous	27
Ketonlar	259	Schiff'in üsleri	26
Aldehitler	207	Heterosiklikler	25
Eterler	100	Epoksitler	25
Hidrokarbonlar	82	Kükürt içerenler	24
Asetaller	63	Pirazinler	22
Laktonlar	61	Aminler/amidler	18
Karboksilik asitler	42	Kinolinler	14
Fenoller	40	Miskler	10
Nitriller	39	Kumarinler	4
Dioksanlar	31		

Koku Bileşenlerinin Toksikitesi ve Güvenlilik Değerlendirmesi

Bir koku malzemesinin güvenlilik değerlendirmesi, bileşiğin kendisinin yanı sıra aynı kimyasal yapı grubuna ait diğer kimyasallar hakkında da detaylı toksikolojik bilgileri içermektedir. Bu bilgiler arasında, akut, sub-kronik, kronik toksisite, mutajenite, dermal tahriş, cilt hassaslaşması, fototoksikite-fotoalerji, solunum toksisitesi, gelişimsel toksisite, üreme toksisitesi, genotoksikite/karsinojenite verileri yer almaktadır [5].

Güvenlilik değerlendirme süreçlerinin geliştirilmesi ve takip edilmesi, kokuların güvenli kullanımının teşvik edilmesi amacıyla 1966 yılında bilime dayalı ve kâr amacı gütmeyen Koku Malzemeleri Araştırma Enstitüsü (The Research Institute for Fragrance Materials – RIFM) ve 1973 yılında Uluslararası Koku Derneği (International Fragrance Association – IFRA) kurulmuştur. RIFM'in temel amaçları arasında; koku malzemelerinin araştırılması, kullanım güvenliğinin değerlendirilmesi ve belirlenmesi, bilimsel verilerin toplanıp analiz edilmesi ve ilgili kuruluşlarla paylaşılması sayılabilir [1].

RIFM kurulduktan sonra Enstitüye rehberlik etmek ve tavsiyelerde bulunmak amacıyla bilim adamları ve doktorlardan oluşan bir Uzman Danışma Paneli (REXPAN) (Panel olarak anılacaktır) oluşturulmuştur. Panel üyeliğine atanacak kişilerde dermatoloji, toksikoloji, patoloji veya çevre bilimi alanlarında uzmanlık; koku endüstrisinden bağımsızlık, araştırmaya dayalı bilimsel bir altyapı koşulları aranmaktadır. Dışarıdan uzmanlar da gerektiğinde danışmanlık sağlayabilmektedir. Şekil 1'de de gösterildiği gibi öncelikle RIFM, Panele araştırmalarını ve yaptığı testlerin sonuçlarını sunar. Ardından Panel tarafından bir güvenlilik değerlendirmesi yapılarak IFRA'ya sunulur. IFRA'nın yaptığı incelemeler sonucunda belirlenen standartlara göre şirketler çalışmalarını şekillendirir. Panel ilk yıllarında dermal maruziyet üzerine yoğunlaşmış olsa da koku bileşenlerinin transdermal absorpsiyonu, solunması ve yutulması potansiyeline ilişkin farkındalığın artmasıyla birlikte odağını genişletmiştir. Son zamanlarda sistemik maruziyet ve toksisite hakkında da çalışmalar yapmaktadır. Panel şu anda dermatoloji, farmakokinetik, toksikokinetik, toksikoloji, patoloji ve çevre bilimi gibi birçok uzmanlığa sahip üyeleriyle birlikte multidisipliner bir şekilde çalışmaktadır. Doğal ve sentetik 2500'den fazla koku bileşeni hakkında yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler RIFM tarafından bir veri tabanında bulunmaktadır. Bu veri tabanı RIFM dışında, yayınlanmış tıbbi, toksikolojik ve çevresel literatürden birçok referansa da ulaşım sağlamaktadır [3].

Mevcut ICH S10 kılavuzu, fotogüvenlilik değerlendirmelerinde dikkat edilmesi gerekenler hakkında detaylı bir rehberlik sağlanmaktadır. Kılavuza göre, değerlendirilmesi yapılacak maddenin, fotokimyasal özelliği, deride dağılımı (farmakokinetik), metabolitleri ve farmakolojik özellikleri göz önünde bulundurulur [6]. 2013 yılından beri birçok ülke tarafından ICH S10 kılavuzundaki standartlar benimsenmiştir [7].



Şekil 1. Koku bileşenleri araştırma [3]

Ülkemizde, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından Kozmetik Ürünlerde Güvenlilik Değerlendirmesi ve Güvenlilik Değerlendiricisi Hakkında Kılavuz yayımlanmış ve sürüm 3.0 ile güncellenmiştir. Bu kılavuza göre “Bir bileşene ilişkin güvenlik değerlendirilmesi, bu bileşene tüm kaynaklardan meydana gelebilecek toplam maruziyet dikkate alınarak yapılır. Bu değerlendirme yapılırken diğer ilgili alanlarda yapılmış risk değerlendirme çalışmalarının sonuçları uygun şekilde gerekçelendirilerek hesaba katılabilir.”

Risk değerlendirme süreci ve basamakları şöyledir:

1. Tehlikenin tanımlanması
2. Maruziyetin değerlendirilmesi
3. Doz-cevap ilişkisinin değerlendirilmesi
4. Risk karakterizasyonu basamaklarını içermelidir [8].

Tehlikenin tanımlanması basamağı için, kullanılan kimyasalın insan sağlığına potansiyel zararının olup olmadığı *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*, *in silico* metotlar, klinik ve epidemiyolojik araştırmalar sonucunda elde edilen verilerle tanımlanır [8]. Maruziyetin doğru değerlendirilmesi oldukça önemlidir [5,8]. Bireylerin potansiyel maruziyetlerini doğru değerlendirebilmek için dikkat edilmesi gereken bazı noktalar vardır. Bunlar; üründe bulunan koku bileşeninin konsantrasyonu, tüketicinin uyguladığı ürün veya ürünlerin toplam miktarı ve kimyasalın yıkanma ile uzaklaşması veya deriden absorpsiyon özellikleri [3]. Doz-cevap ilişkisinin değerlendirilmesi basamağında ise, maruziyet ve toksik cevap arasındaki ilişki için bir hareket noktası (POD-Point of Departure) belirlenir. POD hesaplamasında Benchmark Dose (kıyaslamalı değerlendirme dozu), NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) ve LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) gibi değerler doz tanımlayıcıları olarak kullanılabilir [8]. Son basamak olan risk karakterizasyonunda farklı maruziyet yollarında ortaya çıkabilecek istenmeyen sağlık etkilerinin görülme sıklığı hesaplanması yapılır. Hem dermal toksisite verileri hem de sistemik etkiler güvenlik sınırı hesaplamasında kullanılır [8].

Ayrıca bir başka güvenlik değerlendirme aracı olarak da TTC (toksikolojik kaygı eşiği), maruziyet sonucu oluşabilecek riskleri karakterize etmek amacıyla kullanılan bir kavram olarak karşımıza çıkmaktadır. Gıda, ilaç, aromalar ve çeşitli kimyasallar için kullanılabilir. Bir kimyasalın toksik etkileri bilinmese bile bu eşiğin altındaki bir maruziyet sonucunda insan üzerinde kayda değer bir riskin olmadığını ifade etmektedir. Güvenli maruz kalma seviyeleri olarak da tanımlanabilmektedir. TTC prensibi temel olarak, bileşiğin yapısının bilinmesi ve geçerli alım tahminlerinin mevcut olması koşuluyla, toksisite verileri bulunmayan kimyasalların gıdalardaki düşük konsantrasyonları için kullanılabilir [8,9]. TTC verilerinin belirlenmesi için yalnızca tehlikenin tanımlanması yetmez, bununla beraber maruziyetin ve kimyasal yapıların potansiyel toksisitelerinin tahmin edilerek yorumlanması gerekmektedir. Bu öngörücü yaklaşımlarla birlikte hayvan deneylerine olan bağımlılığın azalması beklenmektedir [9]. TTC yaklaşımının uygulanmasında insan sağlığına

yönelik potansiyel risklerin değerlendirilebilmesi için bazı verilerin incelenmesi gerekir. Bunlar:

- Bileşik hakkındaki mevcut veriler (kimyasal yapı, bileşik hakkındaki *in vitro*, *in vivo*, *in silico* veriler),
- Potansiyel olarak ne kadar maruziyetin yaşanacağı hakkında bilgi,
- Benzer kimyasal yapılara sahip bileşiklerin kronik toksisite test verilerine dayalı tahmin edilen *in vivo* toksisite verileri [9].

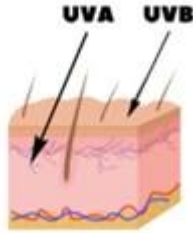
TTC yönteminin kullanılmasıyla birlikte, insan maruziyet miktarlarının bu değer altında olması durumunda gereksiz kapsamlı toksisite testlerinden ve güvenlilik değerlendirmelerinden kaçınmak mümkün olacaktır. Bu yöntemle kazanılan vakitte, daha büyük risk oluşturan maddelerin test edilmesi ve güvenlilik değerlendirmelerinin yapılması, maliyet ve uzmanlık kaynaklarının bu yönde ayrılmasına olanak tanınacaktır [9].

Koku karışımları için güvenlilik değerlendirmeleri yapılırken incelenen istenmeyen etkilerden biri de fototoksisite ve fotoalerji testleridir. Fotoalerji, fototoksisiteye göre daha az görülmesine rağmen mutlaka ölçülmelidir [3]. Derlememizde bu iki etki üzerinde durulacaktır.

Fototoksisite (Fotoiritasyon) / Fotoalerji

'Phos' eski Yunancada ışık için kullanılan bir terimdir. Foton ise ışığın veya diğer elektromanyetik dalgaların enerjisini temsil eder. Fotonun soğurulmasıyla, temsil ettiği enerji kuantumu alınmaktadır. Böylece soğuran molekül temel durumdan uyarılmış duruma geçer [7]. İnsanlar ve yeryüzünde yaşayan tüm canlılar güneş ışığına sürekli olarak maruz kalmaktadır. Vücudun içi ile dışı arasında çevresel mikroorganizmalar, kimyasal maddeler, radyasyon ve çeşitli alerjenlere karşı bir bariyer görevi gören cilt bu ışınlardan en çok etkilenen bölgedir [10,11]. Cilt insan vücudunda eksojen kimyasallara maruz kalan yüzey alanı en geniş organdır [10].

Gözle görülmeyen bir enerji çeşidi olan radyasyonun genel olarak güneş ışınları ile birleşimi UV (ultraviyole) radyasyonu olarak karşımıza çıkar. Ayrıca UV radyasyona bronzlaşma kabinleri, bazı halojen, floresan ve akkor lambalar, lazer veya civa buharı içeren aydınlatmalar da neden olabilir [12]. UV radyasyonu, elektromanyetik spektrumun X ışınları ile görünür ışık arasındaki kısmıdır. UV'nin 3 çeşidi vardır: UVA, UVB ve UVC.



Şekil 2. UVA ve UVB ışınlarının deride absorpsiyonu

En uzun dalga boyuna sahip olan UVA deride dermis tabakasına erişebilirken ondan daha kısa dalga boyuna sahip olan UVB deride epidermise kadar ulaşabilir. En kısa dalga boyuna sahip olan UVC ve bazı UVB çeşitleri ise ozon tabakası tarafından emilir (Şekil 2) [12]. Akut UV maruziyeti güneş yanığına, bronzlaşmaya, UV kaynaklı immüno-supresyona ve DNA hasarına yol açabilir. Kronik UV'ye maruz kalma ise, yaşlanma, kümülatif DNA hasarı ve artan karsinogenez ile ilişkilidir. UVB çoğunlukla eritem, fotokarsinogenez ve nadiren eksojen ışığa duyarlılık ile ilişkilendirilmiştir. Gecikmiş pigmentasyona UVB neden olurken, ani pigment koyulaşması UVA'dan kaynaklanır [13]. Her ne kadar radyasyona maruz kalmanın zararlı etkileri olsa da UVB'ye belli dozlarda maruz kalındığında cildin kemik ve kas sağlığında önemli olan D vitamini (D3 vitamini-kolekalsiferol) üretmesine yardımcı olduğu çalışmalarla kanıtlanmıştır [12]. D3 vitamininin UVB ve oksidatif DNA hasarından etkilenen cilt hücrelerini koruyucu etkiye sahip olduğu ispatlanmıştır [14]. Ayrıca UV radyasyonu, bazen diğer tedavi yöntemlerine yanıt vermeyen belirli hastalıkları (raşitizm, sedef hastalığı, egzama, vitiligo) tedavi

etmek için “fototerapi” uygulamaları için yararlıdır [12].

Sağlıklı biyolojik süreçler dışında, güneş ışınları tarafından olumsuz süreçler de meydana gelir. Bu olumsuz reaksiyonlara kısa dalga boylu UV ışınları ve mavi ışık- görünür spektrum içinde nispeten kısa dalga boylu bir parçası yoluyla neden olduğu bilinmektedir [7]. Cilt tarafından absorpsiyon yoluyla cilt yanığı, eritem- döküntü, hiperpigmentasyon, fotoyaşlanma ve sıklıkla ışığa maruz kalmanın cilt kanserlerin oluşabilmektedir, yüksek enerjili fotonu oluşturan bir disiplindir [7,10]. Kliniğe bakıldığında, ışığa duyarlılığın en yoğun güneş ışığı alan bölgelerde olduğu sonucuna varmak mümkündür. Bu bölgeler içerisinde; yüz, boyun, göğsün üst kısmı, ense, sırtın üst kısmı, ön kollar ve elleri sayabiliriz [15,16].

Işığa duyarlılık, ışığın sebep olduğu doku reaksiyonlarının tümünü tanımlamak için kullanılır, ışığa duyarlılaştırıcılar ise fototoksik ajanları ve fotoalerjenleri kapsayan genel bir terimdir [6,16]. Işığa duyarlılık, klinik olarak cildin ışığa bağlı değişikliklere karşı duyarlılığının artması ile meydana gelen tüm cilt reaksiyonlarını temsil eder. Kimyasal açıdan bakılması gerekirse foton emiliminin moleküler sürecini ifade etmektedir [7]. Bir kimyasalın fototoksik veya fotoalerjik özellikler gösterebilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir, bunlardan bir veya birkaçı karşılanması durumunda bileşiğin fototoksikite açısından risk taşıdığını söyleyebiliriz [6].

- Doğal güneş ışığı dalga boyunda emilim göstermesi (290-700 nm),
- UV-görünür ışığın emilmesini sonucunda reaktif bir ürün oluşturması,
- Işığa maruz kalan cilt, göz gibi dokularda mümkün olduğunca dağılması gerekir [6].

UVB (290-320 nm) epidermis tarafından tamamen emilir. UVA (320-400 nm) ve görünür ışık bölgesi (400-700 nm) daha derinlere nüfuz eder ve kılcal damarlara dolayısıyla kan akımına ulaşır [7]. Sistemik bir uygulamada (oral, IV vb.) sadece UVB aralığında absorpsiyon gösteren ve neredeyse hiç UVA aralığında absorpsiyon gerçekleştirilmeyen kimyasalların fototoksikite açısından risk taşımadığını söylemek mümkündür. Topikal bir uygulamada kimyasalın UVB ışınına maruz kalmasıyla fototoksik reaksiyonların görülmesi olasıdır [7]. İntravenöz uygulanan fotokimyasal bir bileşik, cildin dermis tabakasındaki kılcallarda dolaşırken UVA ışınlarına maruz kalması sonucunda fotoreaksiyona girebilmektedir [17]. Işığa duyarlı reaksiyonlar yılın herhangi bir zamanında pencere camlarından da geçerek cilt üzerine etki gösterebilirler. Standart pencere camları UVB radyasyonu filtrelerken UVA radyasyonu filtremez. Bu da bireylerin kapalı bir ortamda bile fototoksik reaksiyonlara maruz kalabileceğini göstermektedir [15].

Fototoksikite (Fotoiritasyon)

Fotoreaktif bir kimyasal bileşene karşı ışık varlığında gelişen akut doku tepkisidir [10]. Işığa maruz kalma ciltte doğrudan hücre hasara ve nekroza sebep olur [16]. Oluşum sürecine bakıldığında ışığa duyarlılaştırıcı bir kimyasal güneşten gelen radyasyon enerjisini emer ve uyarılmış bir moleküle dönüşür. Ardından hücre hasarından sorumlu olan oksijene bağımlı reaksiyonlar meydana gelir. Bu reaksiyonlar lipidlerin ve proteinlerin oksidasyonuna ve DNA hasarına yol açar. Hücreler reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı; süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz enzimi gibi bazı mekanizmalara sahiptir. Bu koruyucu mekanizmaların yetersiz kalması sonucu DNA’da onarılamaz değişiklikler meydana gelir ve hücre hasarı oluşur [14]. Yapılarında benzen veya heterosiklik halkalar gibi kromofor grupların bulunduğu kimyasalların fototoksikite açısından risk taşıdığı bilinmektedir [10]. Fototoksikitenin yaygın klinik belirtilerinde cilt tahrişi ya da abartılı güneş yanığı semptomları (ağrılı eritem, kaşıntı, ödem gibi) kendini göstermektedir [10-15].

Bir bileşiğin fotoreaktif olarak kabul edilebilmesi için 290 ile 700 nm dalga boyları arasındaki bir fotonu absorbe etmesi gerekmektedir [6]. Bu dalga boyu aralığındaki fotonları absorbe etmeyen kimyasalların fototoksikiteye neden olmadığını söyleyebiliriz [10]. 290 ile 700 nm arasındaki bir dalga boyunda $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ‘den daha büyük bir molar sönme katsayısına (MEC) sahip olmayan bir bileşiğin fototoksikite oluşturacak kadar fotoreaktif bir ürün olduğunu söyleyemeyiz [6]. Fotoaktif veya fotoreaktif kimyasallar UV ışınları ile aktive edildiğinde fototoksikite başlar [10]. Işıkla uyarılan moleküller enerjinin transfer mekanizmalarıyla süperoksit anyonu ve tekli oksijen gibi ROS oluşumuna sebep olabilir. ROS oluşumunun görülmesi fototoksikite varlığını gösterebilir [6]. Bu sitotoksik bileşenler, hücresel lipitlere, proteinlere ve DNA’ya hasar vererek hücre ölümü ve cilt tahrişi meydana gelir [10-16]. Etkilenen bölgelerden alınan biyopsilerde keratinosit nekrozu, ödem, lenfositik ve

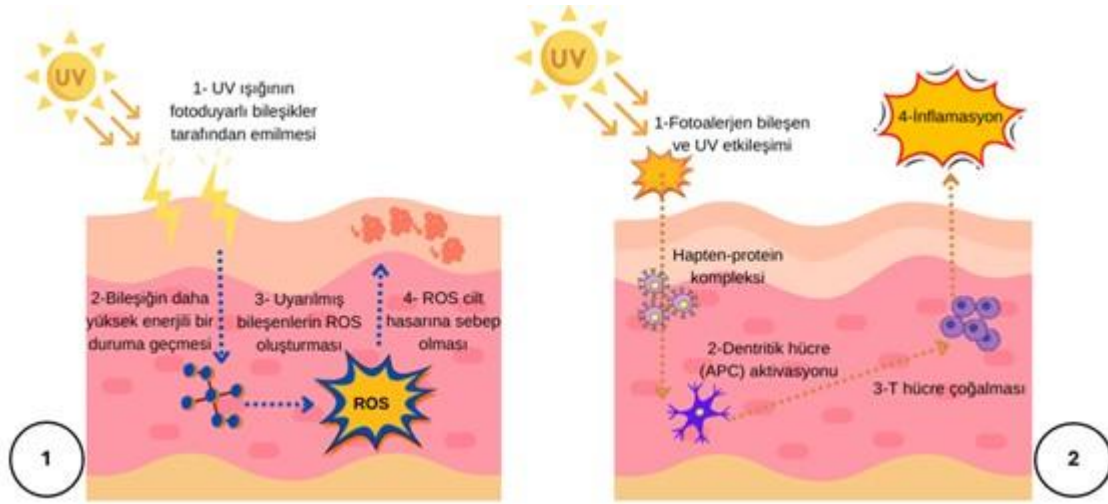
nötrofilik infiltrasyonlar görülür [16].

Fototoksik reaksiyonlar, genellikle 320-450 nm dalga boyu aralıklarında UVA ile ortaya çıkar ve hem insanlarda hem de deney hayvanlarında (domuz, tüysüz fare, sıçan ve tavşan) klinik tablo şeklinde gözlemlenir [18]. İlaça bağlı ışığa duyarlılık üzerinden örnek vermemiz gerekirse, ilaca bağlı fototoksik reaksiyonların klinik belirtileri genellikle güneş ışığına maruziyetin ardından 30 dakika ile 24 saat içerisinde başlar ve kimyasalın türüne göre geçici olabilir veya 4 güne kadar sürebilir [15].

Fotoalerji

Işık varlığında gerçekleşen bir kimyasal reaksiyonun sonucunda meydana gelen ürünlerin oluşmasıyla, o kimyasala karşı gelişen immünolojik reaksiyonları ifade eder [6].

Fotoalerji ya da fotosensitizasyonda ise fototoksiteden farklı olarak foto-haptenleştirilmiş ürünlerin antijen sunan hücreler ya da T hücreleri tarafından tanınması sonucu bağışıklık tepkisi oluşmaktadır [10]. Fotoaktive edilmiş kimyasal cilt proteinleri ile etkileşime girerek hapten adı verilen yapılar oluşturur. Hapten tek başına immünolojik yanıt oluşturmaz ancak proteinle kompleks oluşturduğunda immunojenik hale gelen bir moleküldür. Fotoalerjik reaksiyonlar için kimyasala daha önceden maruz kalmak gerekir ve tekrarlanan maruziyet sonucunda gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonu ortaya çıkmaktadır [15-10]. Fotoalerjinin mekanizması alerjik kontakt dermatitin mekanizmasına benzerdir, ancak ışığa maruziyet sonucu gelişmesiyle farklılık göstermektedir. Klinik olarak fototoksisite ve fotoalerjiyi ayırt etmek zor olabilir [16]. Fototoksisitenin fotoalerjiden daha yaygın olduğunu söylemek mümkündür [16]. Fotoalerjik etki gösteren kimyasalların çoğunun fototoksik etkisinin de olduğunu söyleyebiliriz [19].



Şekil 3. Fototoksisite ve fotoalerji oluşum mekanizmaları

Şekil 3'te 1 numaralı görselde fototoksisitenin aşamaları gösterilmiştir. İlk aşamada UV ışınının deriye ulaşmasıyla birlikte fotoduyarlı bileşen tarafından emildiği görülmektedir. Ardından bu enerji aktarımıyla birlikte fotoduyarlı bileşen uyarılarak yüksek enerjili bir duruma geçmektedir. Uyarılmış bileşikler ROS (Reactive Oxygen Species-Reaktif Oksijen Türleri) oluşturur. Son olarak da bu bileşikler cilt hasarına sebep olur ve fototoksisite gözlenir. 2 numaralı görselde ise fotoalerji oluşumunun aşamaları gösterilmiştir. Fotoalerjen bileşene UV ışınlarının temasıyla birlikte bir etkileşim meydana gelir. Ardından cilt üzerinde Hapten-Protein kompleksleri oluşur. Bu kompleksler antijen sunucu hücrelerden (Antigen Presenting Cell-APC) dentritik hücrelerin aktivasyonuna sebep olur. Bu aktivasyon ile birlikte bölgede T hücrelerinin çoğalması gerçekleşir ve inflamasyon yanıtı oluşur.

Klinik uygulamalar sırasında ilaçların neden olduğu deri döküntüleri, deri karsinom ve melanom sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Bu yüzden ilaca bağlı aşırı duyarlılık reaksiyonlarının dikkate alınması, mekanizmalarının bilinmesi, bu reaksiyonları ve sonucunda meydana gelecek deri hasarlarını önlemek açısından önemlidir. Birden fazla ilacın bir arada kullanılması fototoksik etkilerin potansiyel

birikimine ve fotoalerjik durumlarda çapraz reaktiviteye sebep olabilmektedir. Topikal ajanlara bakıldığında hem fototoksik hem de fotoalerjik reaksiyonlara sebep olabilmektedirler. Sık görülen topikal ajanlardan olan hidrokortizon, asiklovir, dibukain gibi etken maddelerin fotoalerjik reaksiyonlara sebep olabileceği raporlanmıştır [14]. Tablo 3'te fototoksik ve fotoalerjik reaksiyonlar arasındaki farklara yer verilmiştir.

Tablo 3. Fototoksosite ve fotoalerjik reaksiyonlar arasındaki farklar [11-14]

Özellikler	Fototoksosite	Fotoalerji
Görülme sıklığı (insidans)	Yüksek	Düşük
Hassaslaştırma	Yok	Var
Başlangıç zamanı	Birkaç dakika-saat	>24 saat
Patofizyoloji	Doğrudan hücre hasarı, DNA hasarı, Reaktif oksijen bileşiklerinin oluşumu, Singlet oksijen bileşiklerinin oluşumu	Antijen sunucu hücreler veya T hücreleri aracılı inflamatuvar yanıt
En sık görülen klinik tablolar	Aşırı güneş yanığı, cilt tahrişi, ağrılı eritem, kaşıntı, ödem	Dermatit, kızarıklık, kaşıntı, döküntü, kabarcık
Doza bağımlılık	+	+/-
Histolojik özellikler	Hücre nekrozu	Dermal lenfositik infiltrasyon
Çapraz reaksiyon	Yok	Genellikle var
Teşhis	Klinik ve fototestler	Klinik ve foto-yama testler

Fototoksitenin, fotodinamik (oksijene bağlı) veya fotodinamik olmayan (oksijenden bağımsız) reaksiyonlar sonucu 2 farklı yolak ile oluştuğu ileri sürülmektedir. Fotodinamik reaksiyonlarda, dolaylı olarak enerji yüklenmiş molekül çevresindeki oksijen bileşikleriyle etkileşerek enerji transferine sebep olur ve ROS oluşumuna neden olur. Oluşan tekli oksijen ve süperoksit anyonları nükleik asitler, membranlar, lipitler ve proteinler gibi hücre bileşenlerine zarar vererek fototoksositeye sebep olur ve ciltte hasara neden olur [10]. Fotodinamik olmayan reaksiyonlarda ise doğrudan fotoreaktif kimyasalın UV ışımına maruz kalmasıyla enerji yüklü bir molekül meydana gelir. Doğrudan yolda bu durum endojen moleküllerin foto bağlanmasıyla sonuçlanır, bu moleküller DNA sarmalına interkalasyon yapar ve fototoksosite ortaya çıkar [10-20]. Fototoksosite reaksiyonlarının muhtemel yolakları Şekil 4'te verilmiştir.

Fototoksitede Kullanılan Testler ve Alternatifleri

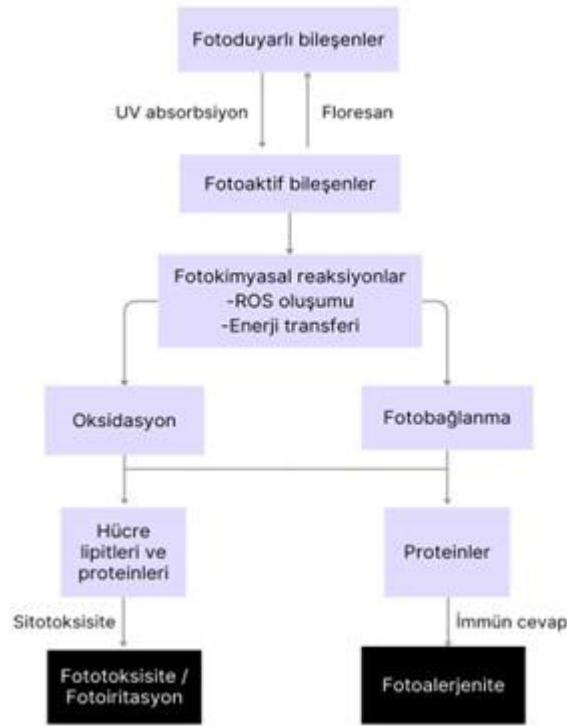
2009 yılında Avrupa Birliği tarafından kozmetik ürünlerde, *in vivo* hayvan deneylerinin yasaklanmasından sonra toksikolojide yer alan 3R kuralı (iyileştirme, hayvan sayısını azaltma, yerine koyma) etkisini yitirip sadece yerine koyma ilkesi ile *ex vivo* ve *in vitro* yöntemler uygulanmaya başlanmıştır [11].

In Vivo Testler

Kobay, sıçan, fare ve tavşan fototoksosite *in vivo* hayvan deneylerinde yaygın olarak kullanılır [11]. Ancak 11 Mart 2013 itibarıyla, Avrupa Birliği'nde hayvanlar üzerinde denenen her tür kozmetik ve kişisel bakım ürününün satışını yasaklanmasına bağlı olarak *in vivo* testler tercih edilmemektedir.

In Vitro Testler

In vitro fototoksosite değerlendirmesinde yöntem prosedürleri ve ayrıntılar OECD tarafından 2023 yılında yayımlanan "Test Guideline No. 498 In vitro Phototoxicity: Reconstructed Human Epidermis Phototoxicity Test Method" da yer verilmiştir.



Şekil 4. Fototoksosite reaksiyonlarının muhtemel yolları [21]

3T3 Nötral Kırmızı Gerilim Testi (3T3 Neutral Red Uptake- 3T3 NRU)

OECD tarafından resmi olarak onaylanmış ve 13 Nisan 2004'te OECD TG432 olarak yayınlanmıştır [10]. Hücre canlılığının, hücreler test kimyasalına maruz bırakıldıktan sonra UV/ VIS ışın varlığı ve yokluğunda kıyaslanması ve hücre canlılığının ışın varlığındaki nispi azalmanın belirlenerek, test kimyasalının fototoksik potansiyelini tespit edilmesine olanak sağlayan bir testtir. Bu testte pozitif olarak tanımlanan kimyasallar, topikal veya sistemik uygulamayı, cilde ve/veya gözlerle dağılımını takiben *in vivo* fototoksik olabilir [22].

Canlı hücrelere nötral kırmızı boyasının intraselüler ortama alınıp lizozomlarda birikmesi ve hücrenin belirlenen madde ve ışına maruz bırakılması sonucu nötral kırmızı boyasının hücreye alım derişimine bağlı azalması sitotoksosite için belirleyici durumdur. Belirlenen maddenin fototoksosite potansiyeli hesaplanırken radyasyon varlığında (UV+) ve yokluğunda (UV-) doz cevap eğrisi kullanılır. "Fotoiritasyon Faktörü (PIF)" veya "Ortalama Foto Etkisi (MPE)" hesaplanır [11]. IC₅₀ değeri, hücre canlılığını %50 oranında düşüren konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır.

$$\text{Fotoiritasyon Faktörü (PIF)} = \text{IC}_{50} (\text{UV-}) / \text{IC}_{50} (\text{UV+})$$

Ortalama Foto Etkisi (MPE), tam konsantrasyon yanıt eğrilerinin karşılaştırılmasına dayanır. Temsili bir Foto Etki değerleri kümesindeki ağırlıklı ortalama olarak tanımlanır [22]. Belirlenen kimyasalda PIF <2 veya bir MPE <0.1 "fototoksik olmadığını", PIF > 2 ve <5 veya bir MPE > 0.1 ve <0.15 "muhtemel fototoksik". PIF > 5 veya bir MPE > 0.15 ise "fototoksik" olarak OECD kılavuzunda belirtilmiştir [22].

3T3 NRU testinin sınırlamaları vardır: Fototoksosite dışındaki advers etkileri tahmin etmekte yetersizdir ve fototoksik etki gücünün değerlendirilmesi için kesinlik sağlamaz [10].

European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) validasyon çalışmalarında bu testin, %93 hassaslık ve %84 özgünlükte olduğu belirtilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda (0.01–10

lg/ml) bile, fototoksik potansiyel tahmini için yüksek hassasiyete sahip tek tabakalı hücre bazlı bir yöntem olan 3T3 NRU testinden elde edilen negatif sonuç, akut ışığa güvenliğinin saptanması için tek başına yeterli bir göstergedir. Bununla birlikte, bu testte pozitif bir sonuç elde edilirse, maddenin fototoksik potansiyeli, *in vivo* bir fototoksik etki üretme gereksinimi olan cilt penetrasyonunu dikkate aldığından 3 boyutlu cilt modelleri kullanılarak daha fazla incelenmesi gerekebilir [6,23].

Nishida ve arkadaşlarının 2015'te yaptığı çalışmada, 3T3 NRU testinin sonuçları *in vivo* deneylerle uyumlu bulunmuştur ancak fotoreaktif olaylar her zaman fototoksik reaksiyonlara neden olmayacağı için fotogüvenlik değerlendirmesi için fotobiyokimyasal reaksiyonlara dayalı diğer *in vitro* fototoksisite testlerine ihtiyaç olduğu ve bu nedenle 3T3 NRU testi, fotoreaktif bileşenlerin fototoksik riskini tahmin etmek için bir takip değerlendirmesi olarak faydalı olacağı vurgulanmıştır [24].

Eritrosit Hemoliz Testi

Eritrositler kolayca izole edilebilir, çekirdek ve DNA içermeyen hücre tipleridir. Bu test protokolü, fotohemoliz ve methemoglobin (met-Hb) oluşumu olmak üzere iki sonuç noktasının birleştirir. Bu sonuç noktaları, hemoglobin spektrumunun optik yoğunluğundaki değişikliklerin sırasıyla 525 nm ve 630 nm'de ölçülmesiyle belirlenir [25]. Bu yöntem test kimyasallarının fototoksik potansiyelini değerlendirmek için kullanılır [11].

In Vitro İnsan 3 Boyutlu Epidermis Modeli

In vitro testlere ek olarak normal insan keratinositlerinden “3 boyutlu (3D) Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermis Modelleri (RhE)” oluşturulmuştur. Temel olarak bu testin prensibi 3T3 NRU testine benzerdir, UV/VIS ışın varlığı ve yokluğu arasındaki doku canlılığı farkının değerlendirilmesine dayanmaktadır. Bununla birlikte, 3D epidermis modelinde, suda çözünmeyen malzemeler test edilebilir ve epidermal tabakadaki primer keratinositlerde metabolik aktivasyon gerektiren maddelerin tespitine de olanak sağlayan metabolik kapasiteye sahiptir [10]. Bu modeller genellikle Stratum corneum tabakasını içerir. EpiDerm, SkinEthic ve EpiSkin 3D doku modelleri *in vitro* fototoksisite testlerinde kullanılmaktadır [11].

In Chemico Testler

Fototoksisiteyi değerlendirmek için hücresiz test tüpü (Cell-free test-tube) yöntemleri, yani *in chemico* yöntemler de araştırılmış ve ışık absorbansı ve kimyasalların fotostabilitesi göz önünde tutularak farklı yöntemler geliştirilmiştir. Fotoreaksiyon sırasında, ROS salınması kullanılarak, bir kimyasalın fototoksik potansiyeli *in chemico* yöntemlerle değerlendirilebilir. Canlı hücre ve doku gerektirmeyen ve plazmid ile fototoksisitenin araştırıldığı *in chemico* bir yöntemde, plazmid tampon içinde çözülür ve test maddeleri ile karıştırılır. Karışım UV ışığına maruz bırakıldıktan sonra numuneler elektroforeze tabi tutulur, DNA ipliklerinde kopma veya kırılma, floresan bazlı ölçüm cihazları kullanılarak tayin edilir. UV ışığına maruziyet sonucu oluşan ROS'ların, DNA ipliklerinde yol açacağı kırılma, kopma gibi durumlar, kimyasal maddenin fototoksisitesi hakkında tehlike tanımlaması yapmaya olanak sağlar ancak fototoksik potansiyelin değerlendirilmesi için kullanılmaz. Test kimyasalının dozu da burada önemli bir parametredir. Bununla birlikte, bu yöntemlerin metabolik aktivasyon kapasitesinin olmaması, suda çözünmeyen malzemelerin (yağlar, katılar, jeller, formüle edilmiş ürünler) uygulanamazlığı ve fotojenotoksisite, fotoalerji (ışığa duyarlılık) veya fotokarsinogenisiteyi tahmin edememe gibi sınırlamaları vardır [10].

In Siliko Testler

In siliko yöntemlerinin uygulanmasına yönelik stratejiler gelişmeye devam etmektedir. Harrison ve ark., *in vitro* fototoksisiteyi modellemek için çeşitli *in siliko* teknolojilerinin birleştirilmesi gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Özellikle ilaçlar için yapılan bu çalışmada, ruhsat almış olan ilaçların fototoksik etkileri hakkında, halka açık raporlardan topladıkları insan veri kümesinden, fototoksisite için bir dizi ayrıcalıklı yapısal parça / model, yani fototoksikoforlar tanımlanmış ve potansiyel fototoksisite

hakkında farklı hipotezler oluşturmuşlardır. Son zamanlarda, makine öğrenimi teknolojisi ile, organik bileşiklerin fotoreaktif potansiyelinin araştırıldığı çalışmalara rastlanmaktadır. Ancak, *in siliko* yöntemler fototoksisteyi tahmin etmede hala çok eksiktirler, çünkü mevcut yaklaşımlar, kimyasala maruz kalan dokulara ışığın dağılımını hesaplayamamaktadır. Fotoaktivasyon, yalnızca yapısal özelliklerin ışık fotonlarıyla etkileşimi tarafından yönlendirilir ve *in siliko* araçlarda bu olayı modellemek için makul bir girişimde bulunsa da, fotoaktivasyon, fototoksistenin kilit bir belirleyicisidir ve bu yöntemlerle tahmin etmek oldukça zordur [7].

Fotogüvenlik Değerlendirme Testleri

Bir farmasötik maddenin fotogüvenlik değerlendirmesi, fotokimyasal özelliklerin, klinik olmayan çalışmalardan elde edilen verilerin ve insan güvenliği bilgilerinin değerlendirilmesini içerebilen entegre bir süreçtir. Fotogüvenlik değerlendirmesi, insanlarda olumsuz olayları önlemek için, riski en aza indigeme önlemlerinin alınıp alınmadığını belirlemeyi amaçlamaktadır [6]. Aşağıda yer alan Tablo 4'te fototoksiste/fotoirritan, fotoalerji ve fotogenotoksiste odaklı yapılan fotogüvenlik testleri verilmiştir.

Tablo 4. Fotogüvenlik değerlendirme testleri [21]

Fototoksiste/Fotoirritan	Fotoalerji	Fotogenotoksiste
Foto-yama testi	Domuz-deri modeli	Foto Ames testi
Foto-bazofil-histamin salım testleri	Foto-h-CLAT	Foto kromozomal sapma testi
Fotohemoliz modeli	Lokal lenf nodu analizi	Foto komet analizi
İnsan yeniden yapılandırılmış epidermis modeli		Kılcal jel-elektroforetik DNA-fotosel bırakma analizi
3T3 NRU fototoksiste testi		DNA-bağlama analizi
Bacillus subtilis'te oksijen tüketimi		IBP analizi
Maya büyüme inhibisyon analizi		

Fototoksik ve Fotoalerjen Özelliği İncelenmiş Bazı Koku Bileşenleri ve Malzemeleri

Kozmetik ve kişisel bakım ürünleri, farmasötik ürünler, ev temizlik ürünlerinin bileşenlerinde sıklıkla yer alan bazı koku bileşenlerinin ve malzemeleri ile ilgili yapılan güvenilirlik değerlendirmesi çalışmaları aşağıda özetlenmiş ve sonuçları Tablo 5'te verilmiştir.

Öjenol: Api ve arkadaşlarının 2016 ve 2022 yıllarında yaptığı iki farklı güvenilirlik değerlendirmesi sonucunda öjenolün fototoksiste ve fotoalerji açısından tehlike yaratmadığı sonucuna varılmıştır. UV/VIS absorpsiyon spektrumları 290-700 nm arasında az miktarda absorpsiyon yaptığı ancak bunun fototoksiste ve fotoalerji açısından endişe verici kriterlerin altında olduğu görülmüştür [26,27].

Hidroksisitronelal: Api ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptığı güvenilirlik değerlendirmelerinin sonucunda hidroksisitronelal isimli koku bileşeninin fototoksik ve fotoalerjenik etkilerinin olması beklenmediği sonucuna varılmıştır. UV/VIS spektrumlarında 290-700 nm arasında absorpsiyonun olmadığı gözlenmiştir [28].

Lavanta Uçucu Yağı: Infante ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptığı çalışmada lavanta uçucu yağının 3T3 NRU testleriyle güvenilirlik değerlendirilmesi yapılmış ve fototoksik etki göstermediği sonucuna varılmıştır [23].

Geraniol: Lapczynski ve arkadaşlarının 2008 yılında ve Api ve arkadaşlarının 2022 yılında geraniol koku bileşeni üzerinde yaptıkları çalışmalarda bileşiğin fototoksiste ve fotoalerji açısından endişe yaratmadığı sonucuna varılmıştır [29-30].

İzoöjenol: Api ve arkadaşlarının 2016 yılında izoöjenol bileşiği için yaptığı güvenilirlik değerlendirmesinde bileşiğin belirli bir konsantrasyona kadar fototoksiste ve fotoalerji açısından risk yaratmadığı sonucuna varılmıştır. UV spektrumlarına bakıldığında 290-700 nm arasında bir miktar

absorbans göstermiştir. Ancak %5'e kadar konsantrasyonda kullanılan izoöjenolün insanlarda fototoksosite/fotoalerji açısından risk yaratması beklenmemektedir [31].

α -Amilsinnamaldehit: Api ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı güvenlilik değerlendirmesine göre α -amilsinnamaldehit fototoksosite ve fotoalerji açısından endişe yaratmadığı sonucuna varılmıştır. UV absorpsiyon spektrumunda 290-700 nm bölgesinde UV ışığını emdiği gözlenmiştir. Ancak kobay testlerinde fototoksik ve fotoalerjik etki gözlenmemiştir [32].

Sinnamaldehit: Bickers ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sinnamaldehit ve sinamik asit 290–400nm UV aralığında emildiğinden, farelerde ve domuzlarda hafif tahrişe neden olduğu, sinnamaldehitin fototoksik veya fotoalerjik potansiyel göstermediğini ancak dermal yolla düşük bir toksisite sırasına sahip olduğu belirtilmiştir [33].

Sinnamil Alkol: Yapılan fotohemoliz ve Candida utilis maya *in vitro* testlerde sinnamil alkolün fototoksik etkileri görüldüğü ve tavşanlarda sinamil alkolün tahrişe neden olduğu gözlenmiştir. Hashimoto ve ark. dermatitli hastalar üzerinde 1990 yılında yaptığı çalışmada ise fotoalerjik etki gözlenmemiştir. Ancak Addo ve ark. (1982) ve Schauder ve Pippen (1997) raporladığı iki farklı çalışmada seyrek de olsa fotoalerjik reaksiyonlar bildirilmiştir [33].

Sinnamik Asit: Bickers ve ark. (2005) yaptığı çalışmada sinnamik asidin fototoksik veya fotoalerjik potansiyel göstermediğini ve %20'ye varan konsantrasyonda sinnamik asitin fotoalerjiyi gösteren cilt değişikliklerine neden olmadığını belirtmiştir [33].

Citrus sp./Limon Yağı: Citrus yağlarının, bir furan halkasına bağlı kumarin temel yapısına sahip doğal bitki bileşenlerinin bir ailesi olan fotoaktif furokumarinleri (psoralenler) içerdiğinden fototoksik reaksiyonlar ürettiği bilinmektedir [34]. Citrus esansiyel yağlarının *in vitro* çalışmalarda fototoksik özellikleri bulunmuştur. Turunçgillerin fototoksik aktivitesi öncelikle bitkide bol miktarda bulunan selinen, pinen, limonen, sabinen ve mirsene atfedilir [35].

Vanilya: RIFM veritabanında vanilya türlerinin fototoksik veya fotoalerjen olmadığı belirtilmiştir [36]. Ayrıca *In vitro* 3T3 NRU testinde Vanilla Tahitensis meyve ekstratı fototoksik olmadığı bulunmuştur [37].

Mentol: RIFM veri tabanında mentol türlerinin fototoksik veya fotoalerjen olmadığı belirtilmiştir [38]. Ayrıca çeşitli nane türlerinde yapılan *in vitro* testlerde ise nanenin fototoksik etkisinin olmadığı gözlenmiştir [39].

Meşe Likeni: Hem UVA hem UVB ışığa maruz bırakılan *in vitro* fotohemoliz deneylerde fototoksik etkiler göstermiştir. Amerika'da 1979 yılında kanarya otuna hassasiyeti olan hastada meşe likenine bağlı fototoksosite olduğu foto-yama test ile belirlenmiştir [19,40].

Sandal Ağacı Yağı: *In vitro* testlerde sandal ağacının fotohemolizi indüklediği ve fototoksik etkilerinin olmadığı ortaya konmuştur [19].

Ylang-Ylang Yağı: Placzek tarafından yapılan çalışmada ylang-ylang yağının fotohemolizi indüklediği bulunmuştur. Ylang-Ylang yağının tüysüz farelerin sırtına seyreltilmeden uygulandığında tahriş edici olmadığı ve Ylang-Ylang yağına yanıt olarak fototoksik etkilerin bulunmadığını bildirilmiştir [19,41].

Bergamot Yağı: Kejlova ve arkadaşlarının 2007 yılında dört farklı çeşit bergamot ile yaptığı 3T3 NRU testinde en yüksek konsantrasyona kadar herhangi bir fototoksosite tespit edilmemiştir [42]. Ancak yapılan foto-yama testlerinde bergamotun bileşenlerinden bergapten ve oksipsöralenin hassasiyete neden olduğu tespit edilmiştir [43]. Türkiye'de ruhsatlanan bergamot yağında bergapten içeren ürünlerin kullanım talimatında (KT) "UV ışığına (doğal ve suni güneş ışığına) duyarlılığı artırılabilir." ibaresi eklenmesi zorunludur [44].

6-Metil Kumarin: 6-Metil kumarin, fotoalerjik ilaçlar ve kimyasallar listesinde yer alır. 6-metil kumarinin fotohemolizi indüklediği ve fototoksik olmadığı, ancak Candida kullanılarak yapılan bir testte UVA kaynaklı 6-metil kumarine bağlı fototoksitenin gösterildiğini bulunmuştur. Ayrıca foto-yama testi, 6-metil kumarine karşı fototoksik ve fotoalerjik reaksiyonları ortaya çıkarmıştır [19].

Hidroksiüzohekzil- 3-siklohekzan karboksaldehit: Parfümlerde sentetik koku verici olarak "Lylal" ismi ile sıklıkla yer almış olan bu maddenin temas alerjiye neden olması nedeniyle kozmetik

ürünlerin içeriğinde yer alması yasaklanmıştır [45]. Lyralin fotoalerjen ve fototoksik etkisini gösteren araştırmalar mevcuttur [46,47].

Peru Balsamı: Peru balsamının fotoalerjik ve fototoksik özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, fototoksik etki göstermediği ancak fotoalerjen olabileceği bulunmuştur [46].

Koku Karışımı: Koku Karışımının fotoalerjik ve fototoksik özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, fototoksik etki göstermediği ancak fotoalerjen olabileceği bulunmuştur [46].

Tablo 5. Sıklıkla kullanılan koku bileşenleri ve malzemelerinin deneysel ve epidemiyolojik olarak fototoksik ve fotoalerjik etkileri

Koku Maddeleri	Fototoksosite		Fotoalerji	
	<i>In vitro / In vivo</i> çalışmalar	Kaynaklar	<i>In vitro / In vivo</i> çalışmalar	Kaynaklar
Öjenol	Negatif	[26,27]	Negatif	[26,27]
Hidroksisitronelal	Negatif	[28]	Negatif	[28]
Lavanta uçucu yağı	Negatif	[23]		
Geraniol	Negatif	[29,30]	Negatif	[29,30]
İsoeugenol	Negatif	[31]	Negatif	[31]
α -amilsinnamaldehit	Negatif	[32]	Negatif	[32]
Sinnamaldehit	Negatif	[33]	Negatif	[33]
Sinnamil alkol	Negatif	[33]	Negatif	[33]
Sinnamik asit	Negatif	[33]	Negatif	[33]
Citrus sp./Limon yağı	Pozitif	[34,35]	Negatif	[34,35]
Vanilya	Negatif	[36,37]	Negatif	[36,37]
Mentol	Negatif	[38,39]	Negatif	[38,39]
Meşe likeni	Pozitif	[19,40]	Pozitif	[19,40]
Sandal ağacı yağı	Negatif	[19]	Negatif	[19]
Ylang-Ylang yağı	Negatif	[19,41]	Negatif	[19,41]
Bergamot yağı	Negatif	[42-44]	Negatif	[42-44]
6-Metil kumarin	Pozitif	[19]	Pozitif	[19]
Hidroksiizohexzil- 3-sikloheksan karboksaldehit	Pozitif	[46,47]	Pozitif	[46,47]
Peru balsamı	Negatif	[46]	Pozitif	[46]
Koku karışımı	Negatif	[46]	Pozitif	[46]

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu derlemede koku bileşenlerinin risk değerlendirme prosesleri, güneş ışığına maruziyet sonucu meydana gelen fototoksosite ve fotoalerji reaksiyonları ve mekanizmaları, bu olumsuz reaksiyonları değerlendirmek için kullanılan test metodlarının özetlenmesi, ayrıca daha spesifik olarak kozmetik formülasyonlarda sıklıkla yer alan bazı koku bileşenlerinin güvenilirlik değerlendirmelerinin fototoksosite ve fotoalerji açısından incelenmesi amaçlanmıştır. Fototoksosite ve fotoalerji reaksiyonlar birbirinden çok farklı mekanizmlar ile ortaya çıkar, fototoksosite, hücre canlılığındaki kayıp iken, fotoalerji inflamasyon yanıt ile birlikte seyrederek. Her iki reaksiyonda da kimyasal madde maruziyet miktarı başlangıç için önemli iken, fotoalerji reaksiyonları kişilerin duyarlanması gerçekleştikten sonra dozdan bağımsız olarak görülür.

Koku bileşenlerini içeren ürün çeşitliliği göz önünde bulundurulduğunda özellikle farklı ürün türleri ile maruziyetin değişeceği ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Örneğin, 60 kg'lık bir bireyin kozmetik

ürünlerdeki belirli bir koku bileşenine maruziyetinin (potansiyel sistemik maruz kalma) hesaplanması sonucunda kg başına düşen maruziyet miktarlarının en yüksek olduğu üründen en düşük olduğu ürüne göre sıralanması; eau de toilette, koku kremi, vücut losyonu, terlemeyi önleyici ürünler, yüz kremi, saç spreyi, sabun, duş jeli, şampuan, diğer durulanan banyo ürünleri şeklindedir [48].

Lokal cilt reaksiyonlarının analizi için, özellikle üründe kullanılacak koku kimyasalına ait maksimum konsantrasyon bilgisinin yer alması gerekir ve en çok maruz kalınan parfüm, koku kremi gibi preparatlar, genel olarak alkol bazlı ve cildin küçük bölgelerine uygulanan ürünler oldukları için belirtilen maksimum konsantrasyon, iritasyon, alerji, fototoksosite ve fotoalerji bakımından değerlendirilir. Sistemik dolaşım açısından ise, feniletıl alkol, kumarin gibi bazı koku bileşenlerinin deriden emilimi oldukça önemlidir. Bileşiğin lipofilitesini belirten oktanol-su dağılım katsayısının 1,3-2.0 aralığında olması insan derisinden transdermal emiliminin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Benzil asetat, kumarin gibi bazı bileşenlerin ise ciltte metabolize olduğu bilinmektedir. Bu metabolizasyon sonucunda emilen kimyasalların biyolojik aktivitesinde değişiklik gözlenebilmekte ve çeşitli lokal etkilere de sebep olabilmektedir [49,50].

Bu derlemede özellikle kozmetik ve kişisel bakım ürünleri, farmasötik ürünler, ev temizlik ürünlerinin bileşenlerinde sıklıkla yer alan bazı koku bileşenlerinin ve malzemeleri ile ilgili yapılan güvenilirlik değerlendirme çalışmaları derlenmiştir. Seçilen koku bileşenlerinden, meşe likeni, 6-metil kumarin ve hidroksiizohexzil- 3-sikloheksan karboksaldehit hem fototoksositeye hem de fotoiritasyona neden olurken, citrus türleri/Limon yağı içerdiği selinen, pinen, limonen, sabinen ve mirsene gibi kimyasallar nedeniyle fototoksositeye, koku karışımı ve peru balsamının sadece fotoalerjiye neden olabileceği yapılan literatür araştırmaları ile tespit edilmiştir. Meşe likeni özellikle parfümeride sıklıkla tercih edilir, popüler parfümlerin %87'sinde bulunur [19], 6-metil kumarin ise, tatlı vanilya kokusuna sahip kumarin yapısında bir koku bileşenidir, IFRA'nın raporunda kozmetiklerde koku maddesi olarak kullanımı özellikle fotosensitizasyon riski nedeniyle tavsiye edilmemektedir. Hidroksiisohexsil 3-sikloheksen karboksaldehit son yirmi yıldır alerji nedeniyle en çok rapor edilen koku kimyasalı olmuştur ve Ağustos 2021'den itibaren kozmetik ürünlerinde yasaklanmıştır [51]. Limon yağı, gıda endüstrisinde, aromaterapi, kozmetik ürünler, parfüm yapımı ve cilt bakım ürünlerinde özellikle antibakteriyel özellikleri nedeniyle sıklıkla kullanılır. Ancak bu ürünler kullanıldığında güneşe maruz kalınmaması olası fototoksik etkiler nedeniyle önem taşımaktadır. Koku karışımı özellikle bireylerin kokulara karşı alerji gösterip göstermediğini anlamak için klinikte uygulanan yama testinde yer alır, karışımın alerjik temas dermatiti yanında ayrıca fotoalerjiye neden olabileceği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Peru balsamı, hem koku vermek hem de antiseptik özelliğinden dolayı birçok üründe yer almıştır. Ancak çapraz alerjik reaksiyon riski ham peru balsamının koku vermek amacıyla kullanımı yasaklanmıştır, distilat ve ekstre halinde kullanımına izin verilmektedir. Alerji potansiyelinin yanında yapılan araştırmalar fotoalerji potansiyelini de ortaya koymuştur.

Özellikle doğal bileşiklerin masum olduğu ile ilgili önyargının, fototoksosite ve fotoalerji oluşturma potansiyelleri dikkate alındığında doğruyu yansıtmadığı yapılan literatür araştırmaları ile ortaya konmuştur. Fototoksosite ve fotoalerji hayat kalitesini olumsuz etkileyen iki önemli sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Koku bileşenlerinin fototoksik ve fotoalerjen özellikleri ile ilgili çalışmaların artırılması hem tüketici hem de ürün güvenliği açısından büyük önem taşımaktadır. Fototoksik ve fotoalerjenik özelliklerin belirlenmesine yönelik araştırmalar, ürünlerin güvenli ve yüksek kalitede olmasını sağlar. Fototoksik ve fotoalerjenik bileşenlerin önceden tespit edilmesi, üretim süreçlerinde ve ürün geliştirme aşamalarında önemli bir adımdır. Bu tip bileşenler hakkında bilgi sahibi olmak, tüketicilerin bilinçli seçimler yapmasına yardımcı olur, bu da cilt sağlığını korumak için bilinçli ürün seçimine olanak sağlar.

YAZAR KATKILARI

Kavram: G.D., İ.Ö., Ö.C.Ü.; Tasarım: G.D., İ.Ö., Ö.C.Ü.; Denetim: G.D., İ.Ö.; Ö.C.Ü., Kaynaklar: G.D., İ.Ö., Ö.C.Ü.; Veri Toplama ve/veya İşleme: G.D., İ.Ö., Ö.C.Ü.; Analiz ve/veya

Yorumlama: G.D., İ.Ö., Ö.C.Ü.; Literatür Taraması: G.D., İ.Ö., Ö.C.Ü.; Makalenin Yazılması: G.D., İ.Ö., Ö.C.Ü.; Kritik İnceleme: G.D., İ.Ö., Ö.C.Ü.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

KAYNAKLAR

1. Api, A.M., Belsito, D., Bruze, M., Cadby, P., Calow, P., Dagli, M.L., Dekant, W., Ellis, G., Fryer, A.D., Fukayama, M., Griem, P., Hickey, C., Kromidas, L., Lalko, J.F., Liebler, D.C., Miyachi, Y., Politano, V. T., Renskers, K., Ritacco, G., Salvito, D., Schultz, T.W., Sipes, I.G., Smith, B., Vitale, D., Wilcox, D.K. (2015). Criteria for the Research Institute for Fragrance Materials, Inc. (RIFM) safety evaluation process for fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, 82(S), 1-19. [CrossRef]
2. Scientific Committee on Consumer Safety. (2012). Opinion on fragrance allergens in cosmetic products. *Scientific Committee on Consumer Safety*, 1459(11), 2-334. Retrieved December 9, 2024, from https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/. Erişim Tarihi: 6 Haziran 2024.
3. Bickers, D.R., Calow, P., Greim, H.A., Hanifin, J.M., Rogers, A.E., Saurat, J.H., Sipes, I.G., Smith, R.L., Tagami, H. (2003). The safety assessment of fragrance materials. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37(2), 218-273. [CrossRef]
4. ECHA (European Chemicals Agency) Web site. (2024). From <https://echa.europa.eu/support/substance-identification/what-is-a-substance>. Erişim Tarihi: 6 Haziran 2024.
5. Api, A.M., Belsito, D., Biserta, S., Botelho, D., Bruze, M., Burton, G.A., Buschmann, J., Cancellieri, M. A., Dagli, M.L., Date, M., Dekant, W., Deodhar, C., Fryer, A.D., Gadhia, S., Jones, L., Joshi, K., Lapczynski, A., Lavelle, M., Liebler, D.C., Tsang, S. (2021). RIFM low-exposure fragrance ingredients safety assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 149, 111981. [CrossRef]
6. CDER, FDA. (2015). International Conference on Harmonisation; S10 Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals; guidance for industry; availability. *Notice. Federal Register*, 80(17), 4282-4283.
7. Harrison, T.J., Chen, X., Yasoshima, K., Bauer, D. (2023). Phototoxicity-medicinal chemistry strategies for risk mitigation in drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 66(14), 9345-9362. [CrossRef]
8. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK). (2021). Kozmetik Ürünlerde Güvenlilik Değerlendirmesine İlişkin Kılavuz Sürüm 3.0 Amaç. *Gastronomía Ecuatoriana y Turismo Local.*, 1(69), 5-24. Retrieved August 13, 2024, from <https://titck.gov.tr/storage/Archive/2024/>. Erişim Tarihi: 6 Haziran 2024.
9. Kroes, R., Kleiner, J., Renwick, A. (2005). The threshold of toxicological concern concept in risk assessment. *Toxicological Sciences*, 86(2), 226-230. [CrossRef]
10. Kim, K., Park, H., Lim, K.M. (2015). Phototoxicity: Its mechanism and animal alternative test methods. *Toxicological Research*, 31(2), 97-104. [CrossRef]
11. Köse, Ö., Erkekoğlu, P., Sabuncuoğlu, S., Koçer-Gümüşel, B. (2017). Kozmetik ürünlerin fototoksik etkileri: Mekanizması ve alternatif test metotları. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21(2), 202-210. [CrossRef]
12. Food and Drug Administration Web site. (2020). From <https://www.fda.gov/radiation-emitting-products/tanning/ultraviolet-uv-radiation>. Erişim Tarihi: 30 Mayıs 2024.
13. Maibach, H.I., Marzulli, F.N. (1986). Photoirritation (Phototoxicity) from topical agents. *Dermatologic Clinics*, 4(2), 217-222. [CrossRef]
14. Lozzi, F., Di Raimondo, C., Lanna, C., Diluvio, L., Mazzilli, S., Garofalo, V., Dika, E., Dellambra, E., Coniglione, F., Bianchi, L., Campione, E. (2020). Latest evidence regarding the effects of photosensitive drugs on the skin: Pathogenetic mechanisms and clinical manifestations. *Pharmaceutics*, 12(11), 1-17. [CrossRef]
15. Di Bartolomeo, L., Irrera, N., Campo, G.M., Borgia, F., Motolese, A., Vaccaro, F., Squadrito, F., Altavilla, D., Condorelli, A.G., Motolese, A., Vaccaro, M. (2022). Drug-induced photosensitivity: Clinical types of phototoxicity and photoallergy and pathogenetic mechanisms. *Frontiers in Allergy*, 3(June), 1-8. [CrossRef]
16. Guan, L.L., Lim, H.W., Mohammad, T.F. (2022). Recognizing photoallergy, phototoxicity, and immune-mediated photodermatoses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 149(4), 1206-1209. [CrossRef]
17. Tønnesen, H.H. (2001). Formulation and stability testing of photolabile drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 225(1-2), 1-14. [CrossRef]

18. Tenenbaum, S., DiNardo, J., Morris, W.E., Wolf, B.A., Schnetzinger, R.W. (1984). A quantitative in vitro assay for the evaluation of phototoxic potential of topically applied materials. *Cell Biology and Toxicology*, 1(1), 1-9. [[CrossRef](#)]
19. Placzek, M., Frömel, W., Eberlein, B., Gilbertz, K., Przybilla, B. (2007). Evaluation of phototoxic properties of fragrances. *Acta Dermato-Venereologica*, 87(4), 312-316. [[CrossRef](#)]
20. Epstein, J.H. (1999). Phototoxicity and photoallergy. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 18(4), 274-284. [[CrossRef](#)]
21. Seto, Y., Hosoi, K., Takagi, H., Nakamura, K., Kojima, H., Yamada, S., Onoue, S. (2012). Exploratory and regulatory assessments on photosafety of new drug entities. *Current Drug Safety*, 7(2), 140-148. [[CrossRef](#)]
22. OECD. (2019). Test Guideline No. 432 In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Retrieved May 13, 2024, from <https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2019/06/>. Erişim Tarihi: 6 Haziran 2024.
23. Infante, V.H.P., Maia Campos, P.M.B.G., Gaspar, L.R., Darvin, M.E., Schleusener, J., Rangel, K.C., Meinke, M.C., Lademann, J. (2022). Safety and efficacy of combined essential oils for the skin barrier properties: *In vitro*, *ex vivo* and clinical studies. *International Journal of Cosmetic Science*, 44(1), 118-130. [[CrossRef](#)]
24. Nishida, H., Hirota, M., Seto, Y., Suzuki, G., Kato, M., Kitagaki, M., Sugiyama, M., Kouzuki, H., Onoue, S. (2015). Non-animal photosafety screening for complex cosmetic ingredients with photochemical and photobiochemical assessment tools. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 72(3), 578-585. [[CrossRef](#)]
25. Pape, W.J., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Steiling, W. (2001). The red blood cell phototoxicity test (photohaemolysis and haemoglobin oxidation): EU/COLIPA validation programme on phototoxicity (Phase II). *ATLA. Alternatives to Laboratory Animals*, 29(2), 145-162. [[CrossRef](#)]
26. Api, A.M., Belsito, D., Botelho, D., Bruze, M., Burton, G.A., Buschmann, J., Cancellieri, M.A., Dagli, M. L., Date, M., Dekant, W., Deodhar, C., Fryer, A.D., Jones, L., Joshi, K., Kumar, M., Lapczynski, A., Lavelle, M., Lee, I., Liebler, D.C., Tokura, Y. (2022). Update to RIFM fragrance ingredient safety assessment, eugenol, CAS Registry Number 97-53-0. *Food and Chemical Toxicology*, 163(April), 113027. [[CrossRef](#)]
27. Api, A.M., Belsito, D., Bhatia, S., Bruze, M., Calow, P., Dagli, M.L., Dekant, W., Fryer, A.D., Kromidas, L., La Cava, S., Lalko, J.F., Lapczynski, A., Liebler, D.C., Miyachi, Y., Politano, V.T., Ritacco, G., Salvito, D., Schultz, T.W., Shen, J., Wilcox, D.K. (2016a). RIFM fragrance ingredient safety assessment, Eugenol, CAS Registry Number 97-53-0. *Food and Chemical Toxicology*, 97, 25-37. [[CrossRef](#)]
28. Api, A.M., Belsito, D., Botelho, D., Bruze, M., Burton, G.A., Buschmann, J., Cancellieri, M.A., Dagli, M. L., Date, M., Dekant, W., Deodhar, C., Fryer, A.D., Jones, L., Joshi, K., Kumar, M., Lapczynski, A., Lavelle, M., Lee, I., Liebler, D.C., Tokura, Y. (2022). RIFM fragrance ingredient safety assessment, hydroxycitronellal, CAS Registry Number 107-75-5. *Food and Chemical Toxicology*, 163, 1-12. [[CrossRef](#)]
29. Api, A.M., Belsito, D., Botelho, D., Bruze, M., Burton, G.A., Cancellieri, M.A., Chon, H., Dagli, M.L., Date, M., Dekant, W., Deodhar, C., Fryer, A.D., Jones, L., Joshi, K., Kumar, M., Lapczynski, A., Lavelle, M., Lee, I., Liebler, D.C., Tokura, Y. (2022). RIFM fragrance ingredient safety assessment, geraniol, CAS registry number 106-24-1. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 167, 113341. [[CrossRef](#)]
30. Lapczynski, A., Bhatia, S.P., Foxenberg, R.J., Letizia, C.S., Api, A.M. (2008). Fragrance material review on geraniol. *Food and Chemical Toxicology*, 46(11), 160-170. [[CrossRef](#)]
31. Api, A.M., Belsito, D., Bhatia, S., Bruze, M., Calow, P., Dagli, M.L., Dekant, W., Fryer, A.D., Kromidas, L., La Cava, S., Lalko, J.F., Lapczynski, A., Liebler, D.C., Miyachi, Y., Politano, V.T., Ritacco, G., Salvito, D., Schultz, T.W., Shen, J., Wilcox, D.K. (2016). RIFM fragrance ingredient safety assessment, isoeugenol, CAS Registry Number 97-54-1. *Food and Chemical Toxicology*, 97, 49-56. [[CrossRef](#)]
32. Api, A.M., Belsito, D., Bhatia, S., Bruze, M., Calow, P., Dagli, M.L., Dekant, W., Fryer, A.D., Kromidas, L., La Cava, S., Lalko, J.F., Lapczynski, A., Liebler, D.C., Miyachi, Y., Politano, V.T., Ritacco, G., Salvito, D., Shen, J., Schultz, T.W., Wilcox, D.K. (2015). RIFM fragrance ingredient safety assessment, α -amylcinnamaldehyde, CAS registry number 122-40-7. *Food and Chemical Toxicology*, 82(S), 20-28. [[CrossRef](#)]
33. Bickers, D., Calow, P., Greim, H., Hanifin, J.M., Rogers, A.E., Saurat, J.H., Sipes, I.G., Smith, R.L., Tagami, H., RIFM expert panel (2005). A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, 43(6), 799-836. [[CrossRef](#)]
34. Tisserand, R., Young R. (1995). *Essential oil Safety: A guide for health care professionals*. Elsevier, Amsterdam, p. 97-98.

35. Erdogan Eliuz, E.A., Ayas, D., Goksen, G. (2017). In vitro phototoxicity and antimicrobial activity of volatile oil obtained from some aromatic plants. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 20(3), 758-768. [\[CrossRef\]](#)
36. Api, A., Belsito, D., Botelho, D., Bruze, M., Burton, G., Buschmann, J., Cancellieri, M., Dagli, M., Date, M., Dekant, W., Deodhar, C., Fryer, A., Jones, L., Joshi, K., Kumar, M., Lapczynski, A., Lavelle, M., Lee, I., Liebler, D., Tokura, Y. (2021). RIFM fragrance ingredient safety assessment, vanillyl butyl ether, CAS Registry Number 82654-98-6. *Food and Chemical Toxicology*, 153, 112361. [\[CrossRef\]](#)
37. Cosmetic Ingredient Safety. (2020). Safety Assessment of Vanilla-Derived Ingredients as Used in Cosmetics, 36. Retrieved June 25, 2024 from <https://www.cir-safety.org/sites/>. Erişim Tarihi: 6 Haziran 2024.
38. Api, A., Belsito, D., Botelho, D., Browne, D., Bruze, M., Burton, G., Buschmann, J., Dagli, M., Date, M., Dekant, W., Deodhar, C., Francis, M., Fryer, A., Joshi, K., La Cava, S., Lapczynski, A., Liebler, D., O'Brien, D., Parakhia, R., Wahler, J. (2017). RIFM fragrance ingredient safety assessment, menthyl acetate (isomer unspecified), CAS Registry Number 16409-45-3. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 619-628. [\[CrossRef\]](#)
39. Nair, B. (2001). Final Report on the safety assessment of Mentha piperita (Peppermint) oil, Mentha piperita (Peppermint) leaf extract, Mentha piperita (Peppermint) leaf, and Mentha piperita (Peppermint) leaf water. *International Journal of Toxicology*, 20(3), 61-73. [\[CrossRef\]](#)
40. Guin, J.D., Jackson, D.B. (1988). Oakmoss photosensitivity in a ragweed-allergic patient. *Contact dermatitis*, 18(4), 240-242. [\[CrossRef\]](#)
41. Burdock, G.A., Carabin, I.G. (2008). Safety assessment of Ylang-Ylang (*Cananga spp.*) as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 433-445. [\[CrossRef\]](#)
42. Kejřlová, K., Jirová, D., Bendová, H., Kandárová, H., Weidenhoffer, Z., Kolářová, H., Liebsch, M. (2007). Phototoxicity of bergamot oil assessed by *in vitro* techniques in combination with human patch tests. *Toxicology In Vitro*, 21(7), 1298-1303. [\[CrossRef\]](#)
43. Zaynoun, S.T., Johnson, B.E., Frain-Bell, W. (1977). A study of oil of bergamot and its importance as a phototoxic agent. II. Factors which affect the phototoxic reaction induced by bergamot oil and psoralen derivatives. *Contact Dermatitis*, 3(5), 225-239. [\[CrossRef\]](#)
44. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK). (2017). Beşeri Tıbbi Ürünlerin Ambalaj Bilgileri ve Kullanma Talimatına İlişkin Kılavuz, Beşeri Tıbbi Ürünlerin Ambalaj Bilgileri ve Kullanma Talimatının Okunabilirliğine İlişkin Kılavuz ve Beşeri Tıbbi Ürünlerin Ambalaj Bilgileri ve Kullanma Talimatındaki Yardımcı Maddelere İlişkin Kılavuz, 33. Retrieved June 11, 2024, from <https://titck.gov.tr/storage/Archive/2024/>. Erişim Tarihi: 6 Haziran 2024.
45. Scientific Committee on Consumer Safety. (2012). Opinion on hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde (sensitisation only). Retrieved June 27, 2024, from https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/. Erişim Tarihi: 6 Haziran 2024.
46. Eun, H.C., An, S., Lee, H., Lee, A., Lee, C.H., Kim, D.W., Moon K, Won Y., Ro, Y., Hahm, J., Kim, K.J. (2004). FS14. 1 Safety of various fragrances: Allergy and phototoxicity, joint study in Korea. *Contact Dermatitis*, 50(3), 174-175. [\[CrossRef\]](#)
47. Tenenbaum, S., DiNardo, J., Morris, W.E., Wolf, B.A., Schnetzinger, R.W. (1984). A quantitative in vitro assay for the evaluation of phototoxic potential of topically applied materials. *Cell Biology Toxicology*, 1(1), 1-9. [\[CrossRef\]](#)
48. Bickers, D., Calow, P., Greim, H., Hanifin, J.M., Rogers, A.E., Saurat, J.H., Sipes, I.G., Smithh, R.L., Tagami, H. (2003). A toxicologic and dermatologic assessment of linalool and related esters when used as fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, 41(7), 919-942. [\[CrossRef\]](#)
49. Hotchkiss, S.A.M., Miller, J.M., Caldwell, J. (1992). Percutaneous absorption of benzyl acetate through rat skin in vitro. 2. Effect of vehicle and occlusion. *Food and Chemical Toxicology*, 30(2), 145-153. [\[CrossRef\]](#)
50. Ford, R.A., Hawkins, D.R., Mayo, B.C., Api, A.M. (2001). The in vivo dermal absorption and metabolism of [4-14C] coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*, 39(2), 153-162. [\[CrossRef\]](#)
51. Ahlström, M.G., Uter, W., Ahlström, M.G., Johansen, J.D. (2021). Decrease of contact allergy to hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde in Europe prior to its ban and diagnostic value. *Contact Dermatitis*, 84(6), 419-422. [\[CrossRef\]](#)



AN OVERVIEW OF 3D PRINTING TECHNOLOGIES FOCUSING MULTIDRUG-LOADED 3D PRINTED DOSAGE FORMS

ÇOKLU İLAÇ YÜKLÜ 3D BASKILI DOZAJ FORMLARINA ODAKLANAN 3D BASKI TEKNOLOJİLERİNE GENEL BAKIŞ

Aysel YILMAZ¹ , Necibe Başaran MUTLU AĞARDAN¹ , Sevgi TAKKA^{1*} 

¹Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06330, Ankara, Türkiye

ABSTRACT

Objective: This review focuses on multidrug-loaded dosage forms produced with three-dimensional printing (3DP) technologies since the confirmation of Spritam[®], the first 3D printed dosage form, in 2015.

Result and Discussion: The integration of multiple drugs within a single dosage form through 3DP offers substantial flexibility in design, allowing for the customization of dosage, drug release profiles, and geometric structures. These formulations offer significant design flexibility by combining different drugs in a single unit, and have the potential to optimize treatment strategies, especially for diseases requiring multiple drug use. The wide literature search reveals that the most commonly used method is Fused Deposition Modeling (FDM) to obtain 3D printed dosage forms with various geometries, such as multi-compartment capsules or tablets, bi-layered or multi-layered tablets exhibiting different release kinetics, and core/shell structured tablets. Multidrug-loaded 3D-printed dosage forms have significant potential for individualizing fixed-dose combinations and have become a promising tool for advancing personalized medicine and improving therapeutic outcomes for polypharmacy. This innovative approach can optimize therapeutic efficacy, reduce side effects, and improve patient compliance. As research continues to expand, these formulations represent a promising direction for the future of drug development and treatment strategies.

Keywords: 3DP technology, multidrug-loaded 3D printlets, personalized medicine, polypills

ÖZ

Amaç: Bu derleme, 2015 yılında onaylanan ilk üç boyutlu baskılı dozaj formu olan Spritam[®]'dan bu yana, üç boyutlu baskılama (3DP) teknolojileriyle üretilen çoklu ilaç yüklü dozaj formlarına odaklanmaktadır.

Sonuç ve Tartışma: 3DP sayesinde, tek bir dozaj formunda birden fazla ilacın entegrasyonu mümkün hale gelmiş olup, bu durum dozaj, ilaç salım profilleri ve geometrik yapılar açısından önemli bir tasarım esnekliği sağlamaktadır. Bu formülasyonlar, farklı ilaçları tek bir üniteye birleştirerek önemli bir tasarım esnekliği sunar ve özellikle birden fazla ilaç kullanımını gerektiren hastalıklar için tedavi stratejilerini optimize etme potansiyeline sahiptir. Geniş literatür araştırması, çok bölmeli kapsüller veya tabletler, farklı salım kinetiği gösteren çift katmanlı veya çok katmanlı tabletler ve çekirdek/kabuk yapılı tabletler gibi çeşitli geometrilere sahip 3D baskılı dozaj formları elde etmek için en yaygın kullanılan yöntemin Eriyik Birikim Modelleme (FDM) olduğunu ortaya koymaktadır. Çoklu ilaç yüklü 3D baskılı dozaj formları, sabit doz kombinasyonlarını kişiselleştirme noktasında önemli bir potansiyel sunmaktadır ve kişiselleştirilmiş tıbbın ilerletilmesinde ve

* Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Sevgi Takka
e-mail / e-posta: takka@gazi.edu.tr, Phone. / Tel: +903122023045

polifarmasiye bağlı terapötik sonuçların iyileştirilmesinde umut vadeden bir araç olarak değerlendirilmektedir. Bu yenilikçi yaklaşım, terapötik etkinliği artırabilir, yan etki riskini azaltabilir ve hasta uyumunu iyileştirebilir. Mevcut araştırmaların ilerlemesiyle birlikte, bu formülasyonlar ilaç geliştirme ve tedavi stratejilerinin geleceği açısından umut verici bir yön sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: 3DP teknolojisi, çoklu ilaç yüklü 3D çıktılar, kişiselleştirilmiş tıp, polipiller

INTRODUCTION

The pharmaceutical industry continuously conducts research to develop drug formulations that are more effective and safer for treating diseases. The drug research involves many steps, such as discovery of new drugs, assessing their efficacy and safety via clinical trials, and refining existing drugs. Research conducted by the pharmaceutical industry significantly increases the therapeutic options for patients to alleviate the burden of disease, enhance quality of life, and prolong the lifespan.

Three-dimensional printing (3DP) technology turned out the 1980s with Charles Hull generated the first available on the market 3D printer using stereolithography (SLA). Subsequently, Fused Deposition Modeling (FDM) technology was developed at the start of the 1990s. During the same period, two other additive manufacturing technologies came into use: Solid Ground Curing (SGC) and Laminated Object Manufacturing (LOM) which were developed by Cubital and Helisys respectively [1-4]. 3DP is defined as a collection of technologies including rapid prototyping, solid freeform manufacturing, and commonly known as additive manufacturing. Additive manufacturing is equivalent to 3DP and uses a range of advanced printing techniques to build pre-designed 3D digital models layer by layer. The most extensive used 3DP technologies include SLA, FDM, Selective Laser Sintering (SLS), 3D Bioprinting and LOM [5].

3DP in healthcare has serious applications in divers' fields comprising implantable medical device manufacturing (vascular stents, prosthetic valves, orthopaedic implants, artificial joint prostheses, human organs) [6], medical imaging (physical visualization) [7], surgical guides/models [8], pharmaceutical dosage form manufacturing [9,10] and dental applications [11]. The first 3D printed dosage form, Spritam® (levetiracetam), improved by Aprexia Proprietary using the ZipDose Technology platform based on powder bed fusion, was authorised by the United States Food and Drug Administration (FDA) in 2015 [1,12,13].

Conventional pharmaceutical methods impose strict constraints on the drug's parameters, such as its dose, form, dimensions and release profile, and these processes only manufacture drug batches with specific, based on majority of patients to achieve the adequate therapeutic response. This may result in some frequent issues associated with using conventional dosage forms; some patients may require a lower dose, while some others may require a higher dose depending on many factors such as patient's health status condition, genetic traits and body structure are different, and a single specification may not suit all patients [14]. At this point, the use of 3DP technology provides revolutionary originality in dosage form design and enables personalized treatment approaches. Various methods of this technology have been developed to meet the patient-specific requirements expected of drugs, thus providing more customized and efficient treatment opportunities. Some of the potential advantages of pharmaceutical products produced with 3DP technology can be summarized as follows:

- Traditional drug products, such as tablets, usually have a simple and uniform structure and are designed to provide a shelf life of usually around two years. In contrast, 3DP technology offers pharmaceutical companies the opportunity to overcome these limitations enabling the development of complex, personalized, and immediately consumable pharmaceutical products.

- Personalized medicine formulations have the potential to minimize side effects by dose adjustments and make easier treatment processes, especially for pediatric and geriatric populations.

- Drugs manufactured on demand could improve emergency treatment applications and generate new opportunities for bringing novel medications with constrained stability to market [15].

- Orphan drugs which are not on market could be manufactured on demand [16].

This review is planned to give a brief introduction to 3DP technologies commonly used in pharmaceutical manufacturing, then focus on multidrug-loaded 3D printed dosage forms including a

summary of the current literature on these dosage forms. Multidrug-loaded 3D printed dosage forms are a particular most advanced applications that 3DP technology offers to the medicinal field. These formulations allow to formulate various drugs in a one single dosage form and, in addition to the advantages of monolithic (generally for drugs with the same dissolution profile), multilayer (when active substances are chemically incompatible or different dissolution profiles are required within the same dosage form) or multiparticle systems (for use with coated pellets and granules) offered by traditional fixed-dose combinations [17], multidrug-loaded 3D printed dosage forms may offer significant potential in patient-centered treatment strategies. This approach may offer significant advantages in optimizing patients' treatment processes and managing drug interactions. Especially for chronic diseases and complex treatment requirements, such formulations can potentially increase patient compliance and improve treatment efficacy.

A Brief Insight to 3DP Technologies Used in Pharmaceutical Manufacturing

3DP has developed and evolved in parallel with technological advances including powder solidification, liquid solidification, and extrusion-based systems [2]. Figure 1 illustrates a schematic representation of 3DP technologies used in drug formulations.

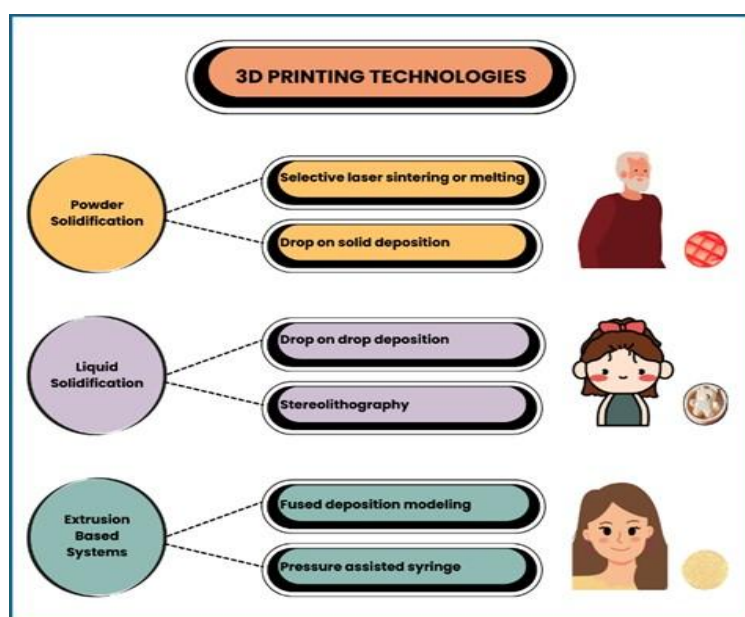


Figure 1. A schematic representation of 3DP technologies used in pharmaceutical formulations

Powder Solidification

The Drop on Solid Deposition (DOS) method, also referred to as binder jetting or drop-on-powder methods, originated at the Massachusetts Institute of Technology (MIT) in the 1980s and was brought to market by Z-Corporation [18]. The production of Spritam[®] is based on the DOS method. This method can be characterized as a form of wet granulation process where ink droplets or binder are deposited onto thin layers of powder, fusing the powder layers in place. Droplets from the inkjet head are used to bring together the loose powder bed layer. In this method, free powder particles function as a supporting material, preventing the collapse of shapes in the structure. After each step, the object is moved downwards via the movable build platform and a new layer of loose powder is added via the roller or powder spray system. In this process, 3D objects with the intended shape are formed by progressively layering each section. The DOS technique allows for the creation of solid oral dosage forms with elevated drug concentrations and is more convenient for pharmaceutical applications in comparison to other 3DP technologies for reason that powders and binder solutions used as starting materials are already commonly employed in the pharmaceutical sector. However, this method requires some

additional steps, for instance, an extra drying step to eliminate residual solvents and increase the physical strength of the printed structures [2,19,20]. Figure 2 provides a representative image of the DOS 3DP technology.

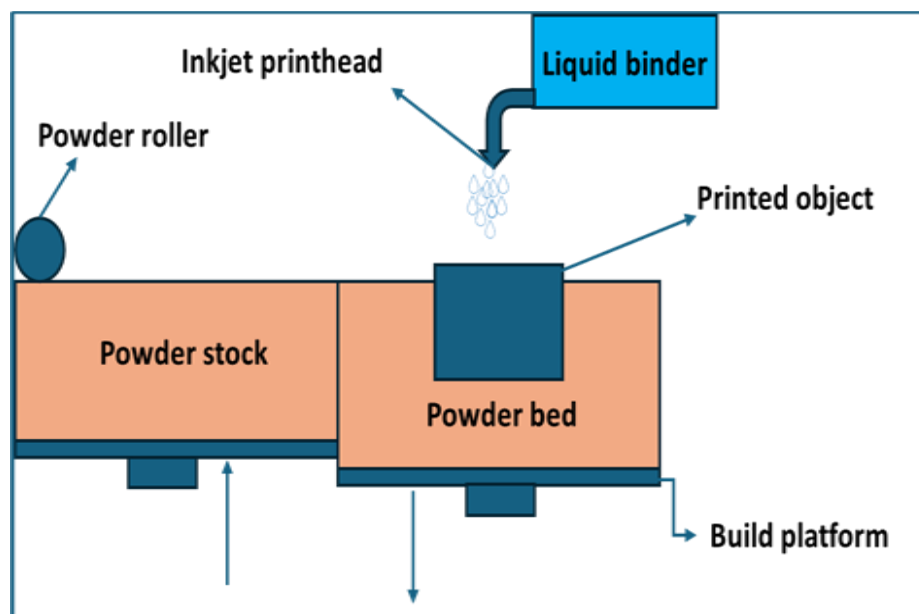


Figure 2. An illustrative diagram of the DOS 3DP technology

Selective Laser Sintering or Melting (SLS/SLM) technique was developed by Carl Deckard in 1984 and is like the DOS method in terms of basic principles. The SLS system comprises three key components: the spreading platform, the powder bed, and the laser system (laser and scanner). In this technique, thermoplastic polymers serve as the primary base material and the surface of the powder is smoothly conveyed to the spreading platform and levelled. The layers are created by lowering the powder bed by one layer thickness, either by sintering (heating to a temperature slightly below the melting point) which fuses the surface of the powder particles, or by melting the polymeric powder layer using a laser beam. This process is repeated to create 3D objects until the entire object is obtained. Once the print is complete, the objects are left embedded in the powder bed, where the bed is slowly cooled to prevent stress. Free powder particles on the build platform serve as a support throughout the process, eliminating the requirement of a secondary support structure. SLS/SLM technology offers a process that requires no solvents, no filaments, no polymerizable monomer/polymer liquid binders and no post-processing. Its solvent-free structure is ideal to produce drug molecules that react to water and organic solvents. The only prerequisite for this method is that the formulation components should be thermoplastic and thermally stable [2,13,21].

Liquid Solidification

The Drop-on-Drop Deposition (DOD) method does not involve a powder bed and are considered as inkjet systems. The ink droplets sprayed from the nozzle are deposited onto thin layers, which are then cured with cooling air or high-energy light. This method requires the use of support material for structures with protruding geometries [2,3].

SLA is the pioneering laser-based printing technology enabling the production of solid objects through the polymerization of liquid resins under ultraviolet (UV) light which developed by Japanese Dr. Kodama in 1980. This 3DP technology implements the formation of 3D objects by triggering the polymerization of photosensitive resin with a high UV laser beam. The laser beam is directed through scanning mirrors, precisely building up layers of the object on the build platform by cross-linking the photosensitive resin. Once each layer is finished, the platform descends by the thickness of one layer.

The heating during the printing process is kept to a minimum, which avoids the thermal degradation of drugs. Additionally, drugs can be integrated into the resin as a solution or suspension prior to printing, ensuring that water solubility does not restrict formulation development. However, the limited availability and toxicity of photo-crosslinkable resins and the high cost of SLA are the major disadvantages of this method [2,3,22-24].

Extrusion Based Systems

Extrusion-based printing is among the most utilized 3DP technologies in pharmaceutical manufacturing. In this approach, a filament or semi-solid material is extruded through a printing nozzle to create 3D objects. The extruded material is deposited in layers according to the shape of the target object, and then these layers are hardened by the cooling process or solidized by evaporation of the solvent [25]. This method can be categorized into two primary types: FDM and Pressure Assisted Modeling (PAM). Since first introduction by Stratasys Corporation in 1992, FDM is one of the most employed methods in the pharmaceutical industry because of its affordability, high product durability, no solvents required and simple equipment. FDM type printers consist of a moving plate and an extrusion head. In FDM printers, drug-loaded filament is pushed through a nozzle, necessitating high temperatures to melt the filament; therefore, pharmaceutical ingredients must be stable in high temperatures. Spinning gears in the print head direct the filament into a heated nozzle, where it melts and then extruded from the nozzle onto the platform, creating 3D structures. The diameter of the filaments used must be compatible with the printer specifications, where the filament requirement can be considered as the restrictive step. Ready to use filaments can be obtained commercially or produced on purpose by Hot Melt Extrusion (HME) method [4,12,26,27]. Figure 3 provides a schematic representation of the FDM 3DP technology.

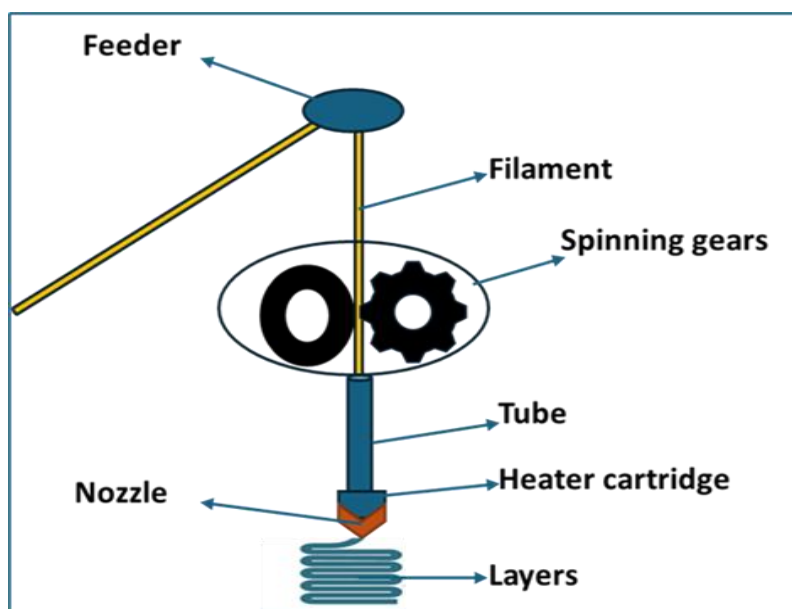


Figure 3. A representative figure of the FDM 3DP technology

Conversely, the PAM method functions at ambient temperature and uses semi-solid materials, eliminating the possibility of active ingredients decomposing in heat. Nevertheless, PAM presents greater difficulty because it demands that the printed materials maintain their shape throughout the deposition process, and post-processing drying of 3D printed products. In the PAM printer, a syringe filled with semi-solid material is placed in an arm that moves above the printing platform. Pressure applied through a pneumatic system, piston, or rotating screw, forces the material through a nozzle, hence creating printed dosage forms. This process is repeated until the desired design is completed and

eventually the 3D object emerges. The rheological characteristics of the semi-solid material employed during printing are crucial. Notably thermally unstable drugs can be easily processed with this method [12,28]. A PAM 3D printer is schematized in Figure 4.

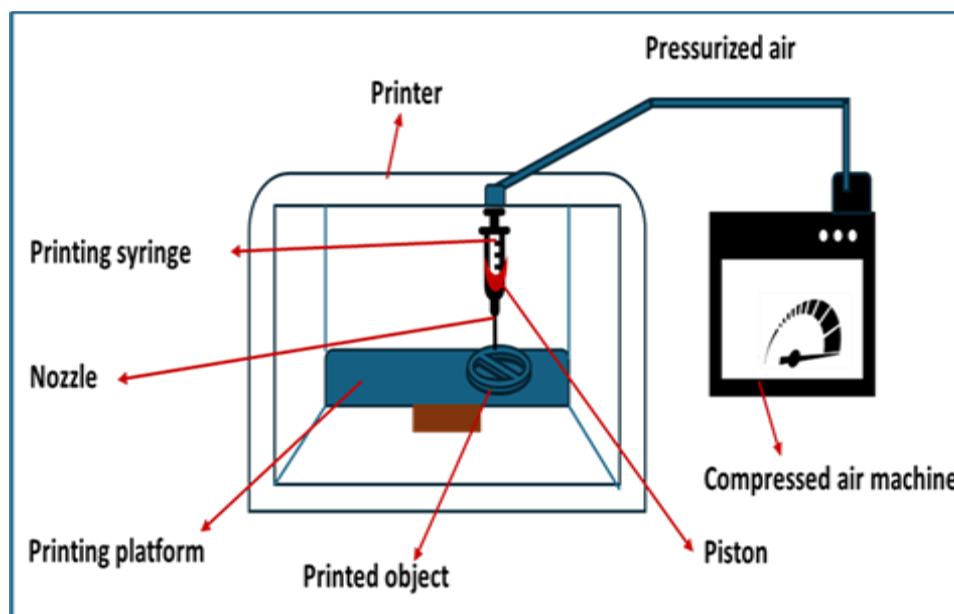


Figure 4. A representative figure of a PAM 3D printer

Multidrug-Loaded 3D Printed Dosage Forms

Combination drug therapies allow targeting multiple biological mechanisms simultaneously providing a superior efficacy compared to single-drug therapies [17,29]. As a fact, the use of multiple prescription medications simultaneously has increased significantly in recent years [30]. Multidrug-loaded dosage forms have the potential to increase patient compliance by simplifying medication management for patients practicing polypharmacy. Combining multiple active ingredients in a single dosage form can reduce dose frequency, improve patient quality of life and the treatment efficiency. Additionally, from an economic perspective, it can reduce the overall cost of medicines by reducing packaging, storage and distribution costs [17]. However, the use of multidrug-loaded dosage forms also has some disadvantages. In particular, standardized dosages that may not fully match the individual treatment needs of each patient may limit treatment flexibility. In addition, the requirement to replace the entire tablet in case of intolerance to a component may complicate the treatment process. Drugs in the same dosage form may cause some *in vivo* incompatibilities in terms of absorption, distribution, metabolism and excretion [17]. Therefore, the use of multidrug-loaded dosage forms should be carefully evaluated according to the specific requirements of each patient, and formulations should be designed accordingly within this framework.

The application of 3DP technologies in manufacturing multidrug-loaded dosage forms stands out as an important development in this field. 3DP can increase treatment flexibility by allowing multidrug-loaded dosage forms to be customized to the individual needs of each patient. By offering combinations specific to each patient, it can lead to better patient compliance and treatment efficacy compared to standard multidrug-loaded dosage forms [31].

After Spritam[®]'s approval, 3DP technology, which has become increasingly prevalent in the field of drug development, gained significant momentum in the manufacturing of multidrug-loaded dosage forms. With advances in technology, this field has allowed for the emergence of innovative formulations. The main reason for this situation is that different 3DP technologies can be applied to eliminate the deficiencies created by traditional methods in the treatment process. Table 1 showcases

examples of notable multi-drug loaded 3D printed dosage forms developed using 3DP technology since 2015.

Table 1. Examples of multi-drug loaded 3D printed dosage forms developed using 3DP technology since 2015

3DP approach, Year	Therapeutic component/s - Objective of formulation
PAM, 2015	Providing an effective cardiovascular treatment regimen with an immediate-release section bearing aspirin, hydrochlorothiazide and sustained-release sections containing pravastatin, atenolol, and ramipril [32].
FDM, 2015	Production of multilayered capsule-shaped tablets containing paracetamol and caffeine exhibiting modified drug release profiles to meet the necessity of personalized treatments [33].
PAM, 2015	Development of a multi-compartment tablet containing captopril, nifedipine and glipizide for managing diabetic patients with hypertension [34].
FDM, 2017	To develop and produce a flexible capsule-based drug delivery system featuring individual compartments that can be filled with different active ingredients or various doses and/or formulations of a single drug; with paracetamol as the model drug [35].
FDM, 2017	Design and production of oral dual-compartment dosage unit for rifampicin and isoniazid, which are first-line combination drugs for tuberculosis treatment that interact with each other when released simultaneously in acidic medium [36].
FDM, 2018	Production of a bilayer oral solid dosage form containing antidiabetic drugs metformin and glimepiride [37].
FDM, 2018	Integrating the benefits of 3DP with the advantages of fixed-dose combinations by producing bilayer tablets of the antihypertensive drugs enalapril maleate and hydrochlorothiazide [38].
PAM, 2018	Production of most commonly used drugs in diabetes mellitus-metformin hydrochloride, glyburide and acarbose- in polypills of different forms (core-shell, multilayer, and gradient distributions) [39].
PAM, 2019	Developing of a single-step 3DP technology that enables the controlled release of efavirenz, tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine drugs which are used as first-line treatment of HIV-1 [40].
SLA, 2019	Printing of paracetamol, caffeine, naproxen, chloramphenicol, prednisolone and aspirin with different geometries and different compositions of materials [41].
FDM, 2019	Concentric chamber capsule design that can be used when pulse release is needed or when dealing with two distinct active substances (model drugs dronedarone hydrochloride and ascorbic acid) need to be administered simultaneously [42].
FDM, 2019	Production of personalized polypills containing lisinopril dihydrate, indapamide, rosuvastatin calcium and amlodipine besylate for managing cardiovascular conditions [43].
FDM, 2020	Design of a novel hollow composite (two medications contained in individual compartments within the suppository shell) rectal suppository formulation loaded with ibuprofen ionic liquid and domperidone [44].
SLS, 2020	Polypill printing of amlodipine and lisinopril for antihypertensive therapy [45].
FDM - Melt Casting Techniques, 2020	Formulation of a multi-compartment polypill with aspirin and simvastatin for cardiovascular disease prevention (drugs were filled into the polypill compartment using melt casting method) [46].

Table 1 (continue). Examples of multi-drug loaded 3D printed dosage forms developed using 3DP technology since 2015

SLA, 2020	Preparation of a multilayer oral dosage form of common antihypertensive drugs (irbesartan, atenolol, hydrochlorothiazide, and amlodipine) [47].
Coaxial bioprinting, 2020	Development of a drug rod (implant) enable to release bevacizumab and dexamethasone by different release kinetics from the same region of the core/shell structure for retinal vascular diseases treatment [48].
FDM, 2021	Manufacture of a bilayer tablet featuring isoniazid and rifampicin for tuberculosis treatment [49].
PAM, 2021	Manufacture of an oral polypill with vitamins B1, B3, B6, and caffeine, designed to provide drug release through two distinct kinetics for personalized supplement delivery [50].
FDM, 2022	Production of a polypill containing pramipexole, levodopa and benserazide enabling to release drugs by varied release kinetics for managing Parkinson's disease [51].
PAM + FDM, 2022	Development of a personalized combi-pill containing tranexamic acid and indomethacin by integrating syringe-based extrusion 3DP with FDM techniques to achieve rapid anti-bleeding and sustained anti-inflammatory effects [52].
FDM, 2022	For antihypertensive therapy, production of core-shell type tablets of fixed-dose combinations of drugs, atorvastatin calcium and amlodipine besylate, as two independent compartments with HME-FDM techniques[53].
FDM, 2022	Producing bilayer tablets of model drugs paracetamol and caffeine citrate [54].
PAM, 2022	Production of cardiovascular polypills containing atorvastatin and metoprolol, to modulate the release of drugs by adjustment of formulation and geometric variables [55].
FDM, 2023	Creation of LEGO®-style compartments for the immediate release of melatonin, with customizable lag times, followed by a controlled release of caffeine for managing sleep disorders [56].
FDM, 2023	Manufacture of polypills incorporating nifedipine, simvastatin, and glimepiride for managing metabolic syndrome [57].
FDM, 2024	Combining artificial intelligence and 3DP technology to create an innovative and personalized capsule containing isoniazid and acetaminophen [58].
FDM, 2024	Developing a gastric floating polypill formulation containing diltiazem, propranolol, and hydrochlorothiazide for hypertension treatment [59].
PAM, 2024	Providing adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin-loaded biodegradable bilayer films [60].

* FDM; Fused Deposition Modeling, PAM; Pressure Assisted Modeling, SLA; Stereolithography, SLS; Selective Laser Sintering

The detailed literature search revealed that dosage forms with various geometries such as multi-compartment capsules or tablets, bi-layered or multi-layered tablets or capsules with different release kinetics, core/shell structured tablets, capsule or rod systems and LEGO®-like compartmental structures could be obtained with different printing techniques. The studies mainly focus on developing multidrug-loaded 3D printed dosage forms for the treatment of diseases that may require the simultaneous use of more than one drug, especially to suggest new treatment strategies for cardiovascular diseases (e.g. hypertension). In addition, multidrug-loaded 3D printed dosage forms have been also investigated for purposes such as antidiabetic effect, analgesic and anti-inflammatory effect, tuberculosis, and HIV treatment. While the availability of different printing techniques (such as SLA, SLS, FDM, bioprinting) in the production of multidrug-loaded 3D printed dosage forms is quite impressive, FDM method is still the most common technique due to its various advantages. In terms of economic aspects, FDM printers

are the most moderate option by far. Additionally, extrusion-based printing techniques are noted to be superior to fabricate more complex structures [17].

There are also studies combining extrusion-based printing with various methods. Fuenmayor et al. [61] developed a manufacturing platform using injection molding (IM) to overcome the low throughput and other limitations of the Fused Filament Fabrication (FFF) process by integrating FFF and IM techniques. In this context, the authors created bilayer tablets with adjustable drug release profiles by incorporating hydrochlorothiazide in the FFF layer and lovastatin in the IM layer. They highlighted this approach as a promising avenue for the mass customization of drug dosage forms. In a similar study conducted by Ebrahimi et al. [62] personalized bilayer tablets loaded with caffeine and paracetamol were produced by integrating Droplet Deposition Modeling (DDM) and IM techniques. In this study, the benefits of both DDM and IM techniques have been integrated for tablet manufacturing.

McDonagh et al. [63] developed two different model formulations, an immediate release erodible system of paracetamol-loaded Eudragit E PO and an erodible/swelling Soluplus system loaded with felodipine using the Arburg Plastic Freeforming (APF) method to achieve simultaneous, delayed, and pulsatile drug release regimes. The direct granule-fed thermal droplet-based 3DP process using APF was thoroughly explained, with the method recommended for pharmaceutical materials unsuitable for other commercial thermal 3DP technologies. Although the tablets produced by the technique successfully provided simultaneous and delayed release profiles, pulsed release could not be achieved due to non-uniform erosion of the tablets under dynamic dissolution conditions.

In addition to multidrug-loaded 3D printed dosage forms, another remarkable field of research is the development of multidrug-loaded 3D printed hearing aids. Lopez et al. [64] detailed the application of 3DP to create hearing aids containing two antibiotics (ciprofloxacin and fluocinolone acetonide). The study, which stated that long-term use of hearing aids causes ear infections, used Kudo 3DSR Flexible resin and Kudo 3DSR ENG hard resin for printing hearing aids by Digital Light Processing 3DP technology. *In vitro* drug release studies demonstrated that both drugs could sustain drug release for over 7 days. The hearing aids also reported to be suitable for sterilization and suggested to be used in the treatment of acute otitis media with tympanostomy tubes. Given that ear anatomy varies from person to person, utilizing 3DP technology for creating drug-loaded hearing aids holds significant potential.

RESULT AND DISCUSSION

In this review, studies conducted on multidrug-loaded 3D printed dosage forms from 2015 to present were systematically examined, and the rising interest on the subject was assessed. The reviewed studies highlighted the promising potential of 3DP technologies in the development of multi-drug loaded formulations and demonstrated how these technologies are increasingly being integrated into drug development processes. 3DP technologies offer substantial benefits in manufacturing of multidrug-loaded dosage forms suggesting great potential, particularly in customizing fixed-dose combinations and the development of patient-specific treatment strategies. 3D printed polypills enable to formulate drugs in the desired doses and combinations for the treatment of diseases that may require more than one drug, such as hypertension and diabetes mellitus. In addition, more complex structures and release profiles can be obtained more effortlessly. However, challenges keep up to date, particularly in optimizing the scale up of the production process, ensuring consistent quality control, and addressing regulatory aspects for 3DP-produced pharmaceuticals. As 3DP technologies continue to evolve, overcoming these hurdles will be critical in enabling wider clinical adoption. While flexibility in the production process offers a great advantage for personalized treatments, creativity in drug design, highlighting patient-specific solutions, and process optimization also increase the future potential of 3DP. In the future, advancements in materials science and printing techniques will likely further expand the application of these technologies in drug development.

ACKNOWLEDGEMENTS

Aysel Yılmaz was supported by scholarships from the CoHE 100/2000 PhD Scholarship Program and by TUBITAK 2211/A Domestic PhD Scholarship Program.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: A.Y., N.B.M.A., S.T.; Design: A.Y., N.B.M.A., S.T.; Control: A.Y., N.B.M.A., S.T.; Sources: A.Y., N.B.M.A., S.T.; Materials: - ; Data Collection and/or Processing: A.Y., N.B.M.A., S.T.; Analysis and/or Interpretation: A.Y., N.B.M.A., S.T.; Literature Review: A.Y., N.B.M.A., S.T.; Manuscript Writing: A.Y., N.B.M.A., S.T.; Critical Review: A.Y., N.B.M.A., S.T.; Other: -

CONFLICT OF INTEREST

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

REFERENCES

1. Sultana, N., Ali, A., Waheed, A., Aqil, M. (2023). 3D Printing in pharmaceutical manufacturing: Current status and future prospects. *Materials Today Communications*, 38, 107987. [\[CrossRef\]](#)
2. Jamróz, W., Szafraniec, J., Kurek, M., Jachowicz, R. (2018). 3D printing in pharmaceutical and medical applications-recent achievements and challenges. *Pharmaceutical Research*, 35, 1-22. [\[CrossRef\]](#)
3. Souto, E., Campos, J., Filho, S., Teixeira, M., Martins-Gomes, C., Zielinska, A., Carbone, C., Silva, A. (2019). 3D printing in the design of pharmaceutical dosage forms. *Pharmaceutical Development and Technology*, 24(8), 1044-1053. [\[CrossRef\]](#)
4. Parulski, C., Jennotte, O., Lechanteur, A., Evrard, B. (2021). Challenges of fused deposition modeling 3D printing in pharmaceutical applications: Where are we now?. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 175, 113810. [\[CrossRef\]](#)
5. Hurst, E.J. (2016). 3D printing in healthcare: Emerging applications. *Journal of Hospital Librarianship*, 16(3), 255-267. [\[CrossRef\]](#)
6. Wang, Z., Yang, Y. (2021). Application of 3D printing in implantable medical devices. *BioMed Research International*, 2021(1), 6653967. [\[CrossRef\]](#)
7. Jia, G., Huang, X., Tao, S., Zhang, X., Zhao, Y., Wang, H., He, J., Hao, J., Liu, B., Zhou, J. (2022). Artificial intelligence-based medical image segmentation for 3D printing and naked eye 3D visualization. *Intelligent Medicine*, 2(1), 48-53. [\[CrossRef\]](#)
8. Chen, X., Possel, J.K., Wacongne, C., Van Ham, A.F., Klink, P.C., Roelfsema, P.R. (2017). 3D printing and modelling of customized implants and surgical guides for non-human primates. *Journal of Neuroscience Methods*, 286, 38-55. [\[CrossRef\]](#)
9. Saydam, M., Timur, S.S., Vural, İ., Takka, S. (2022). Cell culture and pharmacokinetic evaluation of a solid dosage formulation containing a water-insoluble orphan drug manufactured by FDM-3DP technology. *International Journal of Pharmaceutics*, 628, 122307. [\[CrossRef\]](#)
10. Koçak, E., Yıldız, A., Acartürk, F. (2021). Three dimensional bioprinting technology: Applications in pharmaceutical and biomedical area. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 197, 111396. [\[CrossRef\]](#)
11. Jaramillo, N., Moreno, A., Ospina, V., Lopera, A., Pelaez-Vargas, A., Cupitra, N., García, C., Paucar, C. (2023). Effect of synthesis on the antimicrobial response of β -TCP/Mg with potential applications in the regeneration of dental tissue: 3D printing of ceramic paste in a β -TCP/Mg/bioglass system. *Materials Letters*, 350, 134907. [\[CrossRef\]](#)
12. Algahtani, M.S., Ahmad, J., Mohammed, A.A., Ahmad, M.Z. (2024). Extrusion-based 3D printing for development of complex capsular systems for advanced drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 663, 124550. [\[CrossRef\]](#)
13. Charoo, N.A., Barakh Ali, S.F., Mohamed, E.M., Kuttolamadom, M.A., Ozkan, T., Khan, M.A., Rahman, Z. (2020). Selective laser sintering 3D printing—an overview of the technology and pharmaceutical applications. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 46(6), 869-877. [\[CrossRef\]](#)
14. Zhu, X., Li, H., Huang, L., Zhang, M., Fan, W., Cui, L. (2020). 3D printing promotes the development of drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110644. [\[CrossRef\]](#)
15. Norman, J., Madurawe, R.D., Moore, C.M., Khan, M.A., Khairuzzaman, A. (2017). A new chapter in pharmaceutical manufacturing: 3D-printed drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 108, 39-50. [\[CrossRef\]](#)
16. Saydam, M., Takka, S. (2020). Improving the dissolution of a water-insoluble orphan drug through a fused deposition modelling 3-Dimensional printing technology approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 152, 105426. [\[CrossRef\]](#)

17. Fernández-García, R., Prada, M., Bolás-Fernández, F., Ballesteros, M.P., Serrano, D.R. (2020). Oral fixed-dose combination pharmaceutical products: Industrial manufacturing versus personalized 3D printing. *Pharmaceutical Research*, 37, 1-22. [\[CrossRef\]](#)
18. Chen, X., Wang, S., Wu, J., Duan, S., Wang, X., Hong, X., Han, X., Li, C., Kang, D., Wang, Z. (2022). The application and challenge of binder jet 3D printing technology in pharmaceutical manufacturing. *Pharmaceutics*, 14(12), 2589. [\[CrossRef\]](#)
19. Gottschalk, N., Burkard, A., Quodbach, J., Bogdahn, M. (2023). Drop-on-powder 3D printing of amorphous high dose oral dosage forms: Process development, opportunities and printing limitations. *International Journal of Pharmaceutics*: X, 5, 100151. [\[CrossRef\]](#)
20. Shi, K., Tan, D.K., Nokhodchi, A., Maniruzzaman, M. (2019). Drop-on-powder 3D printing of tablets with an anti-cancer drug, 5-fluorouracil. *Pharmaceutics*, 11(4), 150. [\[CrossRef\]](#)
21. Awad, A., Fina, F., Goyanes, A., Gaisford, S., Basit, A.W. (2020). 3D printing: Principles and pharmaceutical applications of selective laser sintering. *International Journal of Pharmaceutics*, 586, 119594. [\[CrossRef\]](#)
22. Deshmane, S., Kendre, P., Mahajan, H., Jain, S. (2021). Stereolithography 3D printing technology in pharmaceuticals: A review. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 47(9), 1362-1372. [\[CrossRef\]](#)
23. Xu, X., Goyanes, A., Trenfield, S.J., Diaz-Gomez, L., Alvarez-Lorenzo, C., Gaisford, S., Basit, A.W. (2021). Stereolithography (SLA) 3D printing of a bladder device for intravesical drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 120, 111773. [\[CrossRef\]](#)
24. Lakkala, P., Munnangi, S.R., Bandari, S., Repka, M. (2023). Additive manufacturing technologies with emphasis on stereolithography 3D printing in pharmaceutical and medical applications: A review. *International Journal of Pharmaceutics*: X, 5, 100159. [\[CrossRef\]](#)
25. Samiei, N. (2020). Recent trends on applications of 3D printing technology on the design and manufacture of pharmaceutical oral formulation: A mini review. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 9(12), 1-12. [\[CrossRef\]](#)
26. Dumpa, N., Butreddy, A., Wang, H., Komanduri, N., Bandari, S., Repka, M.A. (2021). 3D printing in personalized drug delivery: An overview of hot-melt extrusion-based fused deposition modeling. *International Journal of Pharmaceutics*, 600, 120501. [\[CrossRef\]](#)
27. Rahim, T.N.A.T., Abdullah, A.M., Md Akil, H. (2019). Recent developments in fused deposition modeling-based 3D printing of polymers and their composites. *Polymer Reviews*, 59(4), 589-624. [\[CrossRef\]](#)
28. Mohammed, A.A., Algahtani, M.S., Ahmad, M.Z., Ahmad, J. (2021). Optimization of semisolid extrusion (pressure-assisted microsyringe)-based 3D printing process for advanced drug delivery application. *Annals of 3D Printed Medicine*, 2, 100008. [\[CrossRef\]](#)
29. Hatami, H., Mojahedian, M.M., Kesharwani, P., Sahebkar, A. (2024). Advancing personalized medicine with 3D printed combination drug therapies: A comprehensive review of application in various conditions. *European Polymer Journal*, 215, 113245. [\[CrossRef\]](#)
30. Melocchi, A., Uboldi, M., Maroni, A., Foppoli, A., Palugan, L., Zema, L., Gazzaniga, A. (2020). 3D printing by fused deposition modeling of single-and multi-compartment hollow systems for oral delivery-A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 579, 119155. [\[CrossRef\]](#)
31. Chen, G., Xu, Y., Kwok, P.C.L., Kang, L. (2020). Pharmaceutical applications of 3D printing. *Additive Manufacturing*, 34, 101209. [\[CrossRef\]](#)
32. Khaled, S.A., Burley, J.C., Alexander, M.R., Yang, J., Roberts, C.J. (2015). 3D printing of five-in-one dose combination polypill with defined immediate and sustained release profiles. *Journal of Controlled Release*, 217, 308-314. [\[CrossRef\]](#)
33. Goyanes, A., Wang, J., Buanz, A., Martínez-Pacheco, R., Telford, R., Gaisford, S., Basit, A.W. (2015). 3D printing of medicines: Engineering novel oral devices with unique design and drug release characteristics. *Molecular Pharmaceutics*, 12(11), 4077-4084. [\[CrossRef\]](#)
34. Khaled, S.A., Burley, J.C., Alexander, M.R., Yang, J., Roberts, C.J. (2015). 3D printing of tablets containing multiple drugs with defined release profiles. *International Journal of Pharmaceutics*, 494(2), 643-650. [\[CrossRef\]](#)
35. Maroni, A., Melocchi, A., Parietti, F., Foppoli, A., Zema, L., Gazzaniga, A. (2017). 3D printed multi-compartment capsular devices for two-pulse oral drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 268, 10-18. [\[CrossRef\]](#)
36. Genina, N., Boetker, J.P., Colombo, S., Harmankaya, N., Rantanen, J., Bohr, A. (2017). Anti-tuberculosis drug combination for controlled oral delivery using 3D printed compartmental dosage forms: From drug product design to *in vivo* testing. *Journal of Controlled Release*, 268, 40-48. [\[CrossRef\]](#)
37. Gioumouxouzis, C.I., Baklavaridis, A., Katsamenis, O.L., Markopoulou, C.K., Bouropoulos, N., Tzetzis, D., Fatouros, D.G. (2018). A 3D printed bilayer oral solid dosage form combining metformin for prolonged

- and glimepiride for immediate drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 120, 40-52. [\[CrossRef\]](#)
38. Sadia, M., Isreb, A., Abbadi, I., Isreb, M., Aziz, D., Selo, A., Timmins, P., Alhnan, M.A. (2018). From 'fixed dose combinations' to 'a dynamic dose combiner': 3D printed bi-layer antihypertensive tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 123, 484-494. [\[CrossRef\]](#)
39. Haring, A.P., Tong, Y., Halper, J., Johnson, B.N. (2018). Programming of multicomponent temporal release profiles in 3D printed polypills via core-shell, multilayer, and gradient concentration profiles. *Advanced Healthcare Materials*, 7(16), 1800213. [\[CrossRef\]](#)
40. Siyawanwaya, M., du Toit, L.C., Kumar, P., Choonara, Y.E., Kondiah, P.P., Pillay, V. (2019). 3D printed, controlled release, tritherapeutic tablet matrix for advanced anti-HIV-1 drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 138, 99-110. [\[CrossRef\]](#)
41. Robles-Martinez, P., Xu, X., Trenfield, S.J., Awad, A., Goyanes, A., Telford, R., Basit, A.W., Gaisford, S. (2019). 3D printing of a multi-layered polypill containing six drugs using a novel stereolithographic method. *Pharmaceutics*, 11(6), 274. [\[CrossRef\]](#)
42. Matijašić, G., Gretić, M., Vinčić, J., Poropat, A., Cuculić, L., Rahelić, T. (2019). Design and 3D printing of multi-compartmental PVA capsules for drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52, 677-686. [\[CrossRef\]](#)
43. Pereira, B.C., Isreb, A., Forbes, R.T., Dores, F., Habashy, R., Petit, J.B., Alhnan, M.A., Oga, E.F. (2019). 'Temporary Plasticiser': A novel solution to fabricate 3D printed patient-centred cardiovascular 'Polypill' architectures. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 135, 94-103. [\[CrossRef\]](#)
44. Tagami, T., Ito, E., Hayashi, N., Sakai, N., Ozeki, T. (2020). Application of 3D printing technology for generating hollow-type suppository shells. *International Journal of Pharmaceutics*, 589, 119825. [\[CrossRef\]](#)
45. Trenfield, S.J., Tan, H.X., Goyanes, A., Wilsdon, D., Rowland, M., Gaisford, S., Basit, A.W. (2020). Non-destructive dose verification of two drugs within 3D printed polyprintlets. *International Journal of Pharmaceutics*, 577, 119066. [\[CrossRef\]](#)
46. Keikhosravi, N., Mirdamadian, S.Z., Varshosaz, J., Taheri, A. (2020). Preparation and characterization of polypills containing aspirin and simvastatin using 3D printing technology for the prevention of cardiovascular diseases. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 46(10), 1665-1675. [\[CrossRef\]](#)
47. Xu, X., Robles-Martinez, P., Madla, C.M., Joubert, F., Goyanes, A., Basit, A.W., Gaisford, S. (2020). Stereolithography (SLA) 3D printing of an antihypertensive polyprintlet: Case study of an unexpected photopolymer-drug reaction. *Additive Manufacturing*, 33, 101071. [\[CrossRef\]](#)
48. Won, J.Y., Kim, J., Gao, G., Kim, J., Jang, J., Park, Y.H., Cho, D.W. (2020). 3D printing of drug-loaded multi-shell rods for local delivery of bevacizumab and dexamethasone: A synergetic therapy for retinal vascular diseases. *Acta Biomaterialia*, 116, 174-185. [\[CrossRef\]](#)
49. Tabriz, A.G., Nandi, U., Hurt, A.P., Hui, H.W., Karki, S., Gong, Y., Kumar, S., Douroumis, D. (2021). 3D printed bilayer tablet with dual controlled drug release for tuberculosis treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 593, 120147. [\[CrossRef\]](#)
50. Goh, W.J., Tan, S.X., Pastorin, G., Ho, P.C.L., Hu, J., Lim, S.H. (2021). 3D printing of four-in-one oral polypill with multiple release profiles for personalized delivery of caffeine and vitamin B analogues. *International Journal of Pharmaceutics*, 598, 120360. [\[CrossRef\]](#)
51. Windolf, H., Chamberlain, R., Bretkreutz, J., Quodbach, J. (2022). 3D printed mini-floating-Polypill for Parkinson's disease: Combination of levodopa, benserazide, and pramipexole in various dosing for personalized therapy. *Pharmaceutics*, 14(5), 931. [\[CrossRef\]](#)
52. Zhang, B., Teoh, X.Y., Yan, J., Gleadall, A., Belton, P., Bibb, R., Qi, S. (2022). Development of combi-pills using the coupling of semi-solid syringe extrusion 3D printing with fused deposition modelling. *International Journal of Pharmaceutics*, 625, 122140. [\[CrossRef\]](#)
53. Alzahrani, A., Narala, S., Youssef, A.A.A., Nyavanandi, D., Bandari, S., Mandati, P., Almotairy, A., Almutairi, M., Repka, M. (2022). Fabrication of a shell-core fixed-dose combination tablet using fused deposition modeling 3D printing. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 177, 211-223. [\[CrossRef\]](#)
54. Zhang, P., Xu, P., Chung, S., Bandari, S., Repka, M.A. (2022). Fabrication of bilayer tablets using hot melt extrusion-based dual-nozzle fused deposition modeling 3D printing. *International Journal of Pharmaceutics*, 624, 121972. [\[CrossRef\]](#)
55. Alayoubi, A., Zidan, A., Asfari, S., Ashraf, M., Sau, L., Kopcha, M. (2022). Mechanistic understanding of the performance of personalized 3D-printed cardiovascular polypills: A case study of patient-centered therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 617, 121599. [\[CrossRef\]](#)

56. Tabriz, A.G., Mithu, M.S., Antonijevic, M.D., Vilain, L., Derrar, Y., Grau, C., Morales, A., Katsamenis, O.L., Douroumis, D. (2023). 3D printing of LEGO® like designs with tailored release profiles for treatment of sleep disorder. *International Journal of Pharmaceutics*, 632, 122574. [\[CrossRef\]](#)
57. Anaya, B.J., Cerda, J.R., D'Atri, R.M., Yuste, I., Luciano, F.C., Kara, A., Ruiz, H.K., Ballesteros, M.P., Serrano, D.R. (2023). Engineering of 3D printed personalized polypills for the treatment of the metabolic syndrome. *International Journal of Pharmaceutics*, 642, 123194. [\[CrossRef\]](#)
58. Hu, J., Wan, J., Xi, J., Shi, W., Qian, H. (2024). AI-driven design of customized 3D-printed multi-layer capsules with controlled drug release profiles for personalized medicine. *International Journal of Pharmaceutics*, 656, 124114. [\[CrossRef\]](#)
59. Zgouro, P., Katsamenis, O.L., Moschakis, T., Eleftheriadis, G.K., Kyriakidis, A.S., Chachlioutaki, K., Monou, P.K., Ntorkou, M., Zacharis, C.K., Bouropoulos, N. (2024). A floating 3D printed polypill formulation for the coadministration and sustained release of antihypertensive drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 655, 124058. [\[CrossRef\]](#)
60. Youssef, S.H., Ganesan, R., Amirmostofian, M., Kim, S., Polara, R., Afinjuomo, F., Song, Y., Chereda, B., Singhal, N., Robinson, N. (2024). Printing a cure: A tailored solution for localized drug delivery in liver cancer treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 651, 123790. [\[CrossRef\]](#)
61. Fuenmayor, E., O'Donnell, C., Gately, N., Doran, P., Devine, D.M., Lyons, J.G., McConville, C., Major, I. (2019). Mass-customization of oral tablets via the combination of 3D printing and injection molding. *International Journal of Pharmaceutics*, 569, 118611. [\[CrossRef\]](#)
62. Ebrahimi, F., Xu, H., Fuenmayor, E., Major, I. (2024). Tailoring drug release in bilayer tablets through droplet deposition modeling and injection molding. *International Journal of Pharmaceutics*, 653, 123859. [\[CrossRef\]](#)
63. McDonagh, T., Belton, P., Qi, S. (2023). Manipulating drug release from 3D printed dual-drug loaded polypills using challenging polymer compositions. *International Journal of Pharmaceutics*, 637, 122895. [\[CrossRef\]](#)
64. Vivero-Lopez, M., Xu, X., Muras, A., Otero, A., Concheiro, A., Gaisford, S., Basit, A.W., Alvarez-Lorenzo, C., Goyanes, A. (2021). Anti-biofilm multi drug-loaded 3D printed hearing aids. *Materials Science and Engineering: C*, 119, 111606. [\[CrossRef\]](#)

Yayım Koşulları

1. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi (Ankara Ecz. Fak. Derg. – J. Fac. Pharm. Ankara), açık erişimli, hakemli bir dergi olup yılda üç kez (Ocak-Mayıs-Eylül) yayımlanır.
2. Dergiye Eczacılığın her alanında daha önce hiç bir 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. Etik Kurul Onayının zorunlu olduğu çalışmalarda, etik kurul onayı alınan kurumun adı ve etik kurul onay numarası, gereç ve yöntem bölümünde ve Etik Kurul Onay bölümünde belirtilmeli ve ilgili belge makale gönderim sırasında yüklenmelidir.
3. Yayın Komisyonuna gelen makaleler en az 2 danışmana gönderilir. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi’nin makale değerlendirme süreci çift taraflı kör hakemlik ilkesiyle yürütülür.
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. Yayımlarda intihal olup olmadığı kontrol edilmelidir. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi’ne yayımlanmak üzere gönderilen makaleler intihal tarama programları (iThenticate) ile taranmalı ve çevrim içi makale gönderim sırasında makalelerin intihal içermediğine dair rapor yüklenmelidir.
7. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi’nin makale yayın ücreti (APC) veya abonelik ücreti yoktur.
8. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi’ne aşağıdaki makale türleri kabul edilir:
 - a) **Özgün makaleler:** Türkçe veya İngilizce hazırlanmış, şekiller ve tablolar dahil tamamı en çok 25 A4 kağıdı sayfası olan, orjinal araştırmaların bulgu ve sonuçlarını açıklayan makalelerdir. Araştırma makalelerinin yenilikçi ve bilime katkı sağlayan çalışmalar olması beklenir. Makaleler, yazım kurallarında belirtilen ana başlıkları taşımaları ve Windows uyumlu bir program kullanılarak hazırlanmalıdır.
 - b) **Derleme makaleler:** Türkçe veya İngilizce hazırlanmış, şekil ve tablolar dahil tamamı en çok 30 A4 kağıdı sayfası olan, yeterli sayıda bilimsel makale taranarak, o güne kadarki gelişmeleri özetleyerek ortaya koyan ve sonuçlarını yorumlayarak değerlendiren makalelerdir. Makaleler, yazım kurallarında belirtilen ana başlıkları taşımaları ve Windows uyumlu bir program kullanılarak hazırlanmalıdır.
 - c) **Kısa bildirimler:** Devam etmekte olan bir çalışmanın bulgularını zaman kaybetmeden duyurmak için Türkçe veya İngilizce yazılan en çok 5 A4 kağıdı sayfası olan makalelerdir. Makaleler, yazım kurallarında belirtilen ana başlıkları taşımaları ve Windows uyumlu bir program kullanılarak hazırlanmalıdır.

Yazım Kuralları

1. Metinler, A4 normunda (21 x 29.7 cm) yazılmış olmalıdır.
2. Metinler A4 normundaki sayfanın sağ ve sol tarafından 2.5 cm., üst ve alt kenarlarından 3 cm. boşluk bırakılarak 1 satır aralıkla yazılmalıdır. Yayımları kabul edilen makaleler doğrudan "Microsoft Word" dosyası halinde çevrim içi olarak sisteme yüklenecektir (online submission). Ana metin yazı karakteri "**Times New Roman**" ve **11 punto** olmalıdır.
3. Sayfa numaraları makalede **belirtilmemelidir**.
4. Paragraf başları **1 cm içeriden** başlamalıdır. Paragraflar arası ilave boşluk bırakılmamalıdır.
5. Başlık sayfasında yayın adı, yazar/yazarların adları, ORCID noları ve yazışma yapılacak yazarın açık adresi, telefon ve e-mail adresi belirtilmeli ve ortalı yazılmalıdır. İlk sayfada başlıktan önce yukarıdan 3 satır aralığı bırakılmalıdır. Başlık ile Öz/Abstract arası 1 satır aralıkla yazılmalıdır. Sorumlu yazarın soyadının üstüne (*) işareti konularak belirtilmelidir. Bu kişinin Adı Soyadı, açık adresi, telefon numarası ve e-mail adresi başlık sayfasının en altında belirtilmelidir.
6. **Yazar Adı** (ilk harfi büyük diğerleri **küçük harf**) ve **SOYADI** (tamamı **büyük harf**) **koyu** olarak başlığın altına bir satır aralık verildikten sonra altına unvan belirtmeden yazılmalıdır. Birden çok yazar varsa virgülle ayrılıp bir boşluk bırakılarak yazılmalıdır. Yazarların soyadları üzerine konulacak rakamlarla hemen isimlerin altındaki satıra kurum adları ve posta adresleri (Örneğin: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06560, Ankara, Türkiye) açıkça yazılmalıdır.
 - **Tüm yazarlar için ORCID numarası** mutlaka beyan edilmelidir. Yazarların ORCID ID'leri ilgili logoya köprü oluşturularak URL linklerinin eklenmesiyle gerçekleştirilmelidir.
7. Uluslararası kısaltmalar kullanılabilir. Metin içinde mililitre için ml; dakika için dak. olarak belirtilen şekliyle yazılmalıdır.
8. Birimler metrik sistemi kullanılarak ifade edilmelidir.
9. Bütün tablo ve şekiller metin içindeki yerlerine yazım alanından taşmadan yerleştirilmiş olmalıdır.
10. Tablolar üstlerine, şekiller (formül, grafik, şema, spektrum, kromatogram, fotoğraf vb.) de altlarına arabik rakamlarla (**Şekil 1.**, **Tablo 2.**) numaralandırılmalı ve metin içinde yer verilmelidir. "Tablo", "Şekil" sözcükleri ile bunlara ait numaralar koyu yazılmalı ve 11 punto olmalıdır. Şekil/Resim (**JPEG formatında**) makale içinde yerleşmiş ve **resimler 300 dpi veya daha yüksek çözünürlükte** olmalıdır. Üzerinde oynanmış (parlaklık, kontrast, gama ayarı vb.) şekillerde şekil altı metninde yapılan ayarlar belirtilmelidir. **Yazarlar, önceki makalelerinden alıntılanmış olsalar bile, diğer kaynaklardan herhangi bir görüntüyü çoğaltmak için ilgili yayıncılardan yazılı izin almalıdır.**
11. **Tablo** başlıkları Tabloların üstüne ve iki yana yaslı ve bunların genişliğini aşmayacak şekilde 11 punto ve bir satır aralıkta yazılmalıdır. Tabloya ait açıklama varsa tablonun altına 9 punto ile yazılmalıdır. Tablo içindeki metin 8-11 punto arasında yazılabilir. **Şekil** başlıkları ise şekillerin altına birer satır aralıkla ortalı ve 11 punto yazılmalıdır. Şekil başlığı ve şekil arasında 6 nk aralık olmalıdır. Tablo ve Şekiller metin içine yerleştirilirken metin ile aralarında 18 nk aralık olmalıdır.

Örnek tablolar için bakınız.

- Tüm satır ve sütun çizgileri yer almalı.
- Tablo tasarımı tüm makalede tek tip ve düz olmalı, herhangi bir renklendirme/gölgelendirme kullanılmamalıdır.
- Tablo içinde yer alan başlıklar **bold/koyu** renkte yazılmalıdır. Tablo başlığı ve tablo arasında 6 nk aralık olmalıdır.

Tablo 1. Türlerine ait morfolojik özellikler

Bitki kısmı*	<i>C. nummularia</i>	<i>C. integerrimus</i>
Yaprak	Genişçe eliptik-orbikular, 0.9-2.5-(4) x 0.5-2.5-(3-5) cm	Orbikulardan ovata kadar farklı şekillerde, 1.2-(4-5) x 0.9-3 cm
Tohum	3.5-4 x 1-2 mm, koyu kahverengi	3-4 x 1.5-2 mm, açık kahverengi

*Açıklama: 9 punto, 1 aralık olmalı.

Tablo 2. Hastaların özellikleri

Demografik bilgiler	A grubu*	B grubu	C grubu
Erkek cinsiyet	10 (%30)	20 (%60)	10 (% 30)
Sigara kullanımı	20 (%60)	10 (%30)	20 (%60)

*Açıklama: 9 punto yazılmalıdır.

Örnek şekil;



Şekil 1. *C. nummularia*'nın genel görünüşü (Yazı karakteri "Times New Roman" ve 11 punto, "1" aralık, ortalı)

12. Makalelerin bölümleri **BAŞLIK** (Türkçe ve İngilizce), **ÖZ**, **ABSTRACT**, **GİRİŞ**, **GEREÇ VE YÖNTEM**, **SONUÇ VE TARTIŞMA**, **TEŞEKKÜR** (varsa eklenmeli), **YAZAR KATKILARI**, **ÇIKAR ÇATIŞMASI**, **ETİK KURUL ONAYI** (varsa eklenmeli) ve **KAYNAKLAR** sırasına uygun olarak hazırlanmalıdır. Bu bölümleri ifade eden başlıklar (Makalenin ilk başlığı hariç) **12 punto ile koyu olarak büyük harflerle ve sayfanın solundan başlanarak** yazılmalıdır. **GİRİŞ**'ten önce ve sonra sırasıyla 18 nk ve 6 nk aralık bırakılmalıdır. Diğer ana başlıklardan önce ve sonra sırasıyla 12 nk ve 6 nk aralık olmalıdır. Bölüm başlıkları ile metin arasında belirtilenin dışında ayrıca aralık **bırakılmamalıdır.**

- **BAŞLIK:** Türkçe ve İngilizce olarak büyük harf ve **ilk başlık** (Türkçe makalelerde Türkçe başlık, İngilizce makalelerde İngilizce başlık ilk başlıktır) **14 punto, koyu** ve ikinci başlık 12 punto, *italik* olarak yazılmalıdır. Başlık metine uygun, kısa, çalışmayı tanıttıcı ve açık ifadeli olmalıdır.
- **ÖZ ve ABSTRACT:** Türkçe (**ÖZ**) ve İngilizce (**ABSTRACT**) olarak makalelerin başında **200**'er kelimeyi geçmeyecek şekilde 10 punto ile *italik* olarak yazılmalıdır. Yabancı dilde yazılmış makalelerde önce **ABSTRACT** daha sonra mutlaka Türkçe olarak **ÖZ** bulunmalıdır. **ÖZ ve ABSTRACT** başlıkları 12 punto ve koyu yazılıp kendi içlerinde alt başlıklar (aşağıda görüldüğü gibi) halinde makalenin özeti sunulmalıdır. Her bir alt başlık 10 punto, koyu, normal yazılmalıdır. Alt başlıkların içeriğindeki metinler *italik* yazılmalıdır. **ÖZ ve ABSTRACT metni blok halinde sağdan ve soldan 1 cm boşluk bırakılarak yazılmalıdır.**

Özgün makalelerde;

ÖZ için kullanılacak alt başlıklar:

Amaç: *Metin italik yazılmalıdır.*

Gereç ve Yöntem: *Metin italik yazılmalıdır.*

Sonuç ve Tartışma: *Metin italik yazılmalıdır.*

Anahtar Kelimeler: *Metin italik yazılmalıdır, alfabetik sıralama gözetilmelidir*

ABSTRACT için kullanılacak alt başlıklar:

Objective: *Metin italik yazılmalıdır.*

Material and Method: *Metin italik yazılmalıdır.*

Result and Discussion: *Metin italik yazılmalıdır.*

Keywords: *Metin italik yazılmalıdır, alfabetik sıralama gözetilmelidir*

Derleme makalelerde;

ÖZ için kullanılacak alt başlıklar:

Amaç: *Metin italik yazılmalıdır.*

Sonuç ve Tartışma: *Metin italik yazılmalıdır.*

Anahtar Kelimeler: *Metin italik yazılmalıdır, alfabetik sıralama gözetilmelidir*

ABSTRACT için kullanılacak alt başlıklar:

Objective: *Metin italik yazılmalıdır.*

Result and Discussion: *Metin italik yazılmalıdır.*

Keywords: *Metin italik yazılmalıdır, alfabetik sıralama gözetilmelidir*

• **Anahtar Kelimeler (Keywords):** En az 3 sözcükten oluşmalı, ilgili dilde alfabetik, *italik* olarak, yalnızca ilk anahtar sözcüğün ilk harfi büyük olacak şekilde (büyük harf kullanılarak yapılan kısaltmalar hariç) aralara virgül konularak yazılmalı son anahtar sözcükten sonra ise bir imla işareti **kullanılmamalıdır.**

- **METİN:** Orijinal Türkçe makalede metin kısmı **GİRİŞ, GEREÇ VE YÖNTEM, SONUÇ VE TARTIŞMA** olmak üzere 3 ana başlıktan oluşmalıdır. Bu ana başlıkların tamamı 12 punto, **büyük harflerle** ve koyu olacak şekilde yazılmalıdır. Derleme makalelerde ise **GİRİŞ** ile **SONUÇ VE TARTIŞMA ana başlıkları olmalı**, diğer başlıklar yazarın belirleyeceği şekilde **her kelimenin ilk harfi büyük diğerleri küçük ve koyu** olacak şekilde yazılmalıdır. Alt başlıklar 11 punto, 1sadır aralık, **bold/koyu** yazılmalı ve sola dayalı olmalıdır Alt başlıklarda numaralandırma sistemi **kullanılmamalıdır.** Alt başlıklardan önce ve sonra 6 nk aralık olmalıdır.
- **GİRİŞ:** Araştırmanın amacı ve konuyla ilgili çalışmaların yer aldığı bölüm olmalıdır.
- **GEREÇ VE YÖNTEM:** Kullanılan gereç belirtilerek, uygulanan yöntem hakkında gerekli bilgiler açıkça ifade edilmelidir. **Bileşiklerin karakterizasyonu** ayrı bir paragraf ile gösterilmeli ve yeni bileşiklerin saflıkları ve yapı aydınlatılmaları sağlanmalıdır. Eğer çalışmada hayvan ya da insan örnekleri/gönüllüler kullanılıyorsa, araştırmacılar tüm işlemlerin ilgili kanun ve kurumsal kılavuzlara uygun şekilde gerçekleştirildiğine ve uygun idari kurul tarafından bu işlemlerin onaylandığına ve Etik Kurul onayı alındığına dair ifadenin çalışma içinde yer almasını sağlamalıdır. Etik Kurul onayının zorunlu olduğu çalışmalarda, etik kurul onayı alınan kurumun adı ve etik kurul onay numarası, gereç ve yöntem kısmında belirtilmelidir. Ayrıca, kullanılan protokol ve prosedürlerin etik olarak gözden geçirildiği ve onaylandığı, makalenin gereç ve yöntem bölümüne eklenmelidir. Detaylı bilgi için lütfen <http://journal.pharmacy.ankara.edu.tr/en/ethical-principles-and-publication-policy/> web sayfasını ziyaret ediniz.

- **SONUÇ VE TARTIŞMA:** Bulguların verilerek değerlendirildiği bölümdür.
 - Dileyen yazar, RESULT AND DISCUSSION bölümünün son paragrafı olarak "Conclusion" başlığı oluşturabilir. Ancak 11 punto Times New Roman karakterinde İlk harfi büyük diğer harfleri küçük olmalıdır.
- **TEŞEKKÜR:** Varsa araştırmayı destekleyen kuruluşa ve katkısı olan kişilere Yazarların Katkısından önce yer alan bu bölümde kısaca teşekkür edilebilir.
- **YAZAR KATKILARI:** Makalede yer alan yazarların katkısı yazarlar tarafından imzalanan Telif Hakkı Devir Sözleşmesi (*Copyright Transfer Agreement*) uyarınca, çıkar çatışması bildiriminden hemen önce, makalede yer alan isim sırası gözetilerek yazılmalıdır. Lütfen bu bildirim için açık ad ve soyad yerine aşağıdaki örnekte olduğu gibi yazarların baş harflerini kullanınız. Yazar katkısı belirtilmeyecek alanlar için “-” işareti konulmalıdır.

Örnek:

YAZAR KATKILARI

Kavram: İ.Y., M.M.H., C.H., K.B.; Tasarım: İ.Y., C.H., I.Ö.G., Ö.Ü.; Denetim: C.H., I.Ö.G., M.M.H., K.B.; Kaynaklar: Ö.Ü., Z.K., K.B., M.M.H., A.K., İ.A., G.A.G., B.G., B.K.; Malzemeler: I.Ö.G., B.E., G.A.G., B.K., D.Ç.P.; Veri Toplama ve/veya İşleme: A.K., Ö.Ü., M.K., A.S., D.Ç.P., T.C.Ş.T.; Analiz ve/veya Yorumlama: Ö.Ü., B.G., T.C.Ş.T., E.K.S.; Literatür Taraması: B.K., D.Ç.P., B.G., B.E.; Makalenin Yazılması: A.K., İ.A., T.C.Ş.T.; Kritik İnceleme: İ.Y., B.G., Ö.Ü., İ.A.; Diğer: -

• **ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI**

Çıkar çatışması varsa ne şekilde olduğu açıkça beyan edilmelidir. Eğer yok ise “Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.” ifadesini kullanmalıdırlar.

• **ETİK KURUL ONAYI**

Çalışmanın sonunda kaynaklardan önce etik kurul onayı alınmışsa hangi kurumdan ve ne zaman alındığı onay numarası ile mutlaka belirtilmeli ve Etik Kurul Onayını makale gönderim sırasında yüklemelidir. Etik kurul onayına gerek olmayan çalışmalarda aşağıdaki cümle yazılmalıdır.

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

- **KAYNAKLAR:** Kaynak yazım stili Amerikan Psikoloji Derneği’ne (APA) göre. Yazı karakteri “Times New Roman” ve 10 punto, “1” aralık, iki yana yaslı. Metinde, geçiş sırasına göre köşeli parantez içinde, örneğin: [1,6,9], [5-7] gibi numaralandırılmalı ve metin sonunda bu numaralara göre sıralanmalıdır. Alt başlıkların yanına kaynak belirtilmemelidir. Tablo içinde kaynak bildirilmesi gerekiyorsa metin içinde verildiği gibi belirtilmelidir.

- **Makale için:** Yazarın soyadı, adının baş harfleri (Birden fazla adı olan yazarın her bir isminin baş harfinden sonra nokta konmalı ve arada boşluk bırakılmamalıdır. Birden fazla yazarların arasında virgül yer almalıdır. **Son yazar ile bir önceki yazar arasında “ve” kelimesi veya “&” sembolü kullanılmamalıdır.**), makalenin tam başlığı, derginin adı, cilt no, varsa sayı no (parantez içinde), başlangıç ve bitiş sayfa numarası (veya makale numarası), yıl yazar isimlerinden sonra (parantez içinde) yazılmalıdır. **Birden fazla yazar varsa hepsi yazılmalıdır.** Makalenin adı yazılırken ilk kelimenin ilk harfi büyük diğer kelimelerin ilk harfi küçük yazılmalıdır. Kaynaklarda verilen **dergi adları kısaltma yapılmadan açık olarak yazılmalıdır.**

Her bir referansın sonuna **[CrossRef]** ekleyerek **şağıdaki formatta DOI numarasını köprü olarak giriniz. Lütfen <https://www.crossref.org/>'da yer almayan makaleleri [CrossRef] şeklinde belirtmeyiniz.**
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90403-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90403-6)

Örnekler:

1. Martinez, M.J.A., Del Olmo, L.M.B., Benito, P.B. (2005). Antiviral activities of polysaccharides from natural sources. *Studies in Natural Products Chemistry*, 30, 393-418. **[CrossRef]**
2. Bahiense, J.B., Marques, F.M., Figueira, M.M., Vargasa, T.S., Kondratyuk, T.P., Endringer, D.C., Scherer, R., Fronzaa, M. (2017). Potential anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of *Sambucus australis*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 991-997. **[CrossRef]**

• **Elektronik Makale için:**

Örnek:

Perneger, T.V., Giner, F. (1998). Randomized trial of heroin maintenance programme for adults who fail in conventional drug treatments. *British Medical Journal*, 317, from <http://www.bmj.com/cgi/content/full/317/7150/> Erişim tarihi: 14.03.2021

• **Web sitesi için:**

Örnek:

Clinical Pharmacology Web site. (2001). Erişim adresi <http://cpip.gsm.com/> Erişim tarihi: 14.03.2021.

- **Kitap için:** Yazarın soyadı, adının baş harfleri, kitabın adı, cilt no (varsa), kitabevi, yayımlandığı şehir, sayfa no, basıldığı yıl (parantez içinde) yazılmalıdır.

Örnek:

Franke, R. (1984). *Theoretical Drug Design Methods*, Elsevier, Amsterdam, p.130.

- **Kitap bölümü için:** Yazarın soyadı, adının baş harfleri, bölümün başlığı, editör/editörlerin soyadı, adının baş harfleri, (Ed./Eds.) ibaresi, kitabın adı, varsa cilt no, kitabevi, yayımlandığı şehir, sayfa no, basıldığı yıl (parantez içinde) yazılmalıdır.

Örnek:

Weinberg, E.D. (1979). Antifungal Agents. In: M.E. Wolff and S.E. Smith (Eds.), *Burger's Medicinal Chemistry*, (pp. 531-537). New York: John Wiley and Sons.

- **Tez için:** Yazarın soyadı, adının baş harfleri, yıl yazar isimlerinden sonra (parantez içinde) yazılıp nokta işareti konmalıdır. Ne tür tez olduğu belirtildikten sonra tezin başlığı, nerde yapıldığı yazılmalıdır.

Örnek:

Ahmed, J. (2008). PhD Thesis. *Pharmaceutical Botany investigations on Prangos Lindl. (Umbelliferae) growing in Konya province*. Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Ankara University, Ankara, Turkey.

- **Patent için:** Yazarın soyadı, adının baş harfleri, yıl yazar isimlerinden sonra (parantez içinde) yazılıp nokta işareti konmalıdır. Patent başlığı ve patent numarası yazılmalıdır.

Örnek:

Mahoney, S., Molz, L., Narayan, S., Saiah, E. (2018). Heteroaryl RHEB Inhibitors and Uses Thereof. WO 2018/191146 A1.

ETİK İLKELER VE YAYIN POLİTİKASI

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, açık erişimli, hakemli bir dergi olup Türkçe veya İngilizce olarak farmasötik bilimler alanındaki önemli gelişmeleri içeren orijinal araştırmalar, derlemeler ve kısa bildirimler için bir yayım ortamıdır. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi'nin makale yayım ücreti (APC) veya abonelik ücreti yoktur.

Yayın kurulu olarak dergi kapsamında önemli katkı sağlayan kaliteli yeni çalışmaların yayınlanması amaçlanmaktadır. Bu amaca ulaşmak için gönderilen makaleler, dergide yayınlanmak için bilimsel ve biçimsel gerekli kriterleri karşıladıklarından emin olmak adına baş editör ve/veya editör yardımcıları tarafından ilk değerlendirmeye tabi tutulur. Yalnızca bu ön değerlendirme sürecini geçen çalışmalar, daha ileri değerlendirme için diğer aşamalara devam ettirilir.

Ön Değerlendirme

- Çalışmanın bilimsel kalitesi ve yeniliği dergide yayınlanmak için yeterli olmalıdır.
- Dergiye gönderilen çalışmalar derginin amaç ve kapsamına uygun olmalıdır.
- Metin İngilizce veya Türkçe olarak dilbilgisi kurallarına uygun ve bilimsel olarak iyi yazılmış olmalıdır.
- Dergiye gönderilen çalışmaların benzerlik oranı %20'yi geçmemelidir.
- Çalışmalar derginin yazım kurallarına ve şablonuna uygun olacak şekilde düzenlenmelidir.
- Telif hakkı devir formu, etik kurul onay belgesi, yazar katkı formu mutlaka yüklenmeli ve imzalı olmalıdır.
- Çalışmalar elektronik online başvuru sistemi aracılığı ile dergiye gönderilmiş olmalıdır.

Bu yeterlikleri taşımayan çalışmaların ileri değerlendirme süreci başlatılamaz.

Dergi yayınlanma sürecinde dergi editörleri, hakemler ve yazarlara bazı sorumluluklar düşmektedir. Bu sorumluluklar aşağıdaki şekilde açıklanmıştır.

1. Editörün Görevleri ve Etik Sorumlulukları

Editör, dergiye gönderilen makalelerden hangilerinin yayınlanması gerektiğine bağımsız olarak tek başına karar verebileceği gibi editör kurulunun üyelerine veya hakemlere de danışabilir. Derginin etik ilkeleri ve yayım politikası çerçevesinde, çalışmaların ön değerlendirme, hakem değerlendirmesi ve yayınlanma aşamalarının tarafsız, denetlenebilir, adil, çıkar ilişkisinden bağımsız ve gizlilik ilkelerine uygun şekilde yürütülmesinden sorumludur. Yayım politikası ve etik ilkeleri açısından ihlal yoksa derginin amacına ve kapsamına uygun çalışmaları, ön değerlendirme aşamasına almalıdır.

Baş editörün, editör yardımcılarının, alan editörlerinin ve editöryal danışma kurulunun görevleri ve tanımları aşağıdaki gibidir:

Baş Editör: Dergi içeriğinin yayınlanması konusunda tam yetkiye sahip kişidir. Editör yardımcıları, alan editörleri ve editöryal danışma kurulu ile birlikte çalışır.

Editör Yardımcıları: Dergi ilgili sorulara cevap vermek, dergi hakem ve kuruluna önerilerde bulunmak, makale yayım sürecinde baş editöre yardımcı olan kişilerdir.

Alan Editörleri: Çift kör hakem atamalarının gerçekleşmesi ve dergi ile ilgili sorulara cevap vermek konusunda yazarlara yardımcı olan kişilerdir.

Editöryal Danışma Kurulu: Editöryal Danışma Kurulu, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisinin, amacına uygun ve kaliteli yayım üretilmesine ilişkin konularda Baş Editör ve Editör Yardımcılarına kılavuzluk eder.

1.1. Yayın Politikası

- Baş editör, dergiye gönderilen makalelerden hangilerinin yayımlanması gerektiği kararından tek başına sorumludur. Editörün kararı, derginin editör kurulunun prensipleri doğrultusunda olabileceği gibi, onur kırıcı yayım yapmak, telif hakkı ihlali ve intihal gibi konularla ilgili olarak yürürlükte olan yasal gereklilikler ile sınırlandırılmıştır.
- Baş editör, makale yayımlanmadan önce yazarların yayımcıya makalenin "Copyright Transfer Form" unu, doldurarak telif hakkını gönderdiğinden emin olmaktadır.
- Baş editör, yazarların makale yayımlanmadan önce "Conflict of Interest Form"unu ve "Author Contribution Form" unu doldurduğundan emin olmaktadır.
- Baş Editör, dergiye gönderilen makalelerin biçimsel olarak incelenmesi için editör yardımcılarını görevlendirmektedir. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisinin kurallarını sağlamayan makaleler kesinlikle değerlendirmeye alınmadan reddedilmektedir.

1.2. Yayın Değerlendirmesi

- Baş editör, yayın değerlendirme sürecinin adil, tarafsız ve zamanına uygun şekilde gerçekleşmesini sağlamaktan sorumludur.
- Editör, tüm makaleleri genel olarak dışardan ve bağımsız en az iki hakem ile değerlendirilmesini sağlamaktadır. Gerek olması durumunda editör üçüncü bir hakemden ek görüş istemektedir.
- Editör, hakem seçimini makale kapsamına uygun olan uzmanları değerlendirerek yapar.
- Editör, olası çıkar çatışmaları için yapılan açıklamaları, hakemler tarafından yapılan "self-citation" önerilerini ve herhangi bir taraflılık olasılığını değerlendirmek ve karar vermek için dikkatli bir şekilde yayın sürecini gözden geçirmektedir.
- Baş editör/editörler, hakem değerlendirme veya değerlendirme/yayım sürecinin herhangi bir noktasında bir benzerlik tespit yazılımı (iThenticate) tarafından taratılmasını yazardan istemektedir veya kendisi yapmaktadır. Bu anlamda ifadelerin veya cümlelerin yazarın/yazarların kendileri olsa dahi metin daha önce yayımlanmış verilerle kabul edilemez bir benzerliğe sahip olmamalıdır.
- Baş editör, bir makaledeki hataları yayımlanmadan önce tespit ederse düzeltmektedir. Eğer daha sonra tespit ederse bu durumda düzeltmeleri yayımlamak zorundadır. Tüm düzeltme veya geri çekme bildirimlerini dergide belirgin bir şekilde yayımlamalıdır. Ayrıca içindekiler sayfasında listelemelidir.
- Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisinin editörleri, Yayın Etiği Komitesi (Committee on Publication Ethics (COPE)) tarafından yayımlanan "[COPE Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors](#)" ve "[COPE Best Practice Guidelines for Journal Editors](#)" kılavuzlarına uyarak çalışmalarını sürdürür.

1.3. Adil Değerlendirme

- Baş editör/editörler, makaleleri yazarların ırk, cinsiyet, cinsel eğilim, inanç, etnik köken, vatandaşlık ya da politik görüşlerine bakmaksızın bilimsel içeriklerine göre değerlendirmektedir. Derginin editöryal prensipleri şeffaf ve tümüyle dürüst değerlendirmeyi desteklemektedir.
- Editör, hakemlerin ve yazarların kendilerinden bekleneni tam olarak anladıklarından emin olmalıdır.
- Editör, dergi ile ilgili tüm iletişimini derginin elektronik başvuru sisteminden yapar ve kararlarında itirazlar olması halinde şeffaf ve hakkaniyetli bir yol izler.

1.4. Gizlilik İlkesi

- Baş editör/editör, dergiye yapılan başvurudaki tüm materyallerin ve hakemlerle yapılan tüm iletişimin gizliliğini (ilgili yazar ve hakemlerle aksi onaylanmadığı sürece) korumakla yükümlüdür.

- Baş editör/editör, hakemlerin isimlerinin açıklanmasını kabul etmediği sürece, hakemlerin kimliklerini ve haklarını korumakla sorumludur.
- Başvurusu tamamlanmış bir makaleye ait basılmamış materyaller, yazarın yazılı onayı alınmadan editörün kendi çalışmaları/araştırmaları için kullanılmamalıdır.
- Baş editör/editör, makale değerlendirme sürecinde edinilen tüm bilgileri veya fikirleri gizli tutmalı ve kişisel amaçlar için kullanmamalıdır.

2. Hakemlerin Görevleri ve Etik Sorumlulukları

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi'nin makale değerlendirme süreci çift taraflı kör hakemlik ilkesiyle yürütölmektedir. Dolayısıyla hakemler yazar/yazarlarla iletişim kuramazlar, değerlendirmeler dergipark yönetim sistemi üzerinden paylaşılır. Değerlendirme sürecinde tam metinlere ilişkin değerlendirme formları hakem yorumları editör aracılığı ile sorumlu yazara iletilir. Hakemler, değerlendirme süreci boyunca tarafsızlık, gizlilik, nesnellik, bilimsel yönden inceleme ilkelerine uygun hareket etmelidir. İlgili alanda uzman ve yetkinliğe sahip olmalıdır. Değerlendirmesine sunulan çalışmaya ilişkin raporunu belirtilen zaman aralığı içinde bitirmelidir. Zamanında sunulamayacak raporlar için gecikmeden editör ile iletişime geçilmelidir. Etik ilkeleri, telif hakkı ihlali, olası çıkar çatışması ve intihal yapıldığının fark edilmesi durumlarında editör kurulunu bilgilendirmelidir.

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi için makaleleri değerlendiren hakemlerin aşağıda belirtilen görevlere ve etik sorumluluklara uyması beklenmektedir.

2.1. Editöryal Kararlara Katkı

- Hakemler, yazarların sundukları çalışmaları yapıcı ve uygun şekilde değerlendirmelidirler.
- Hakemler, makalede yer alan araştırmayı değerlendirmeye yetkin olmadığını düşünüyorsa veya yeterli sürede tamamlayamayacaksa editöre durumu bildirmelidirler.
- Hakemler, yazarlara yönelik sert ve kişisel eleştirilerde bulunmamalıdır.
- Hakemler, makale değerlendirmesi için davet aldığıında eğer kendilerini makalede çalışılan konu hakkında yetersiz hissedersen makaleyi değerlendirmeyi reddetmelidirler.
- Hakemler, makale değerlendirmesini verilen süre içinde yapmalıdırlar.
- Hakemler, sadece çalışmanın içeriğine ilişkin değerlendirmeyi objektif olarak yapmalıdırlar.

2.2. Gizlilik

- Hakemler, değerlendirmeyi tarafsızlık ve gizlilik içerisinde yapmalıdırlar.
- Hakemler, makale hakkındaki değerlendirmelerini ya da bilgilerini üçüncü kişilerle paylaşmamalıdırlar.
- Hakemler, makale değerlendirme sürecinde edinilen bilgileri, fikirleri ve basılmamış materyal veya çalışmaları gizli tutmalı ve kişisel amaçlar için kullanmamalıdırlar.
- Hakemler, makalenin bir kopyasını elinde bulundurmamalı veya çoğaltmamalıdırlar.

2.3. Etik Sorunları Fark Etme

- Hakemler, makalede yer alan etik sorunları fark etmeli ve editörün dikkatine sunmalıdırlar.
- Hakemler, makalenin daha önce başka bir yerde basıldığını veya basılmış önceki bir makale ile önemli ölçüde benzerlik ya da örtüşme tespit ederse editöre bildirmelidirler. Daha önce yayımlanmış olan herhangi bir gözlem ve/veya argüman, ilgili referans ile birlikte verilmelidir.

2.4. Tarafsızlık ve Rekabet Standartları

- Hakemler, tarafsız olarak değerlendirmelerini yapmalı ve önyargıdan uzak şekilde değerlendirmelidirler. Yazarın kişi olarak eleştirilmesi uygun değildir. Hakemler, görüşlerini destekleyici argümanlarla ifade etmelidirler.

- Hakemler, makale değerlendirmeyi kabul etmeden önce olası çıkar çatışmasını kontrol etmelidirler. Eğer çıkar çatışmasıyla karşı karşıya olduğunu düşünüyorsa makaleyi incelemeyi reddetmeli ve editörü bilgilendirmelidirler.
- Hakemler, yazar tarafından hakemin (ya da hakemle çalışan kişilerin) çalışmalarının kaynak olarak alındığını ileri sürerse, gerçek bilimsel gerekçeler sunmalılar, bu durumun hakemin kaynak gösterilme sayısını ya da çalışmalarının görünürlüğünü artırmaya yönelik bir girişim olmamasına özen göstermelidirler.
- Hakemler, değerlendirmelerini yaparken bilimsel gerçeklikten uzaklaşmamalı ve gerekirse kaynak gösterme yoluna başvurmalıdırlar.

3. Yazarların Görevleri ve Etik Sorumlulukları

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi'ne gönderilen makaleler, daha önce herhangi bir yayın organında yayımlanmamış olmalıdır veya yayımlanmak üzere aynı zaman diliminde başka bir yayın organına gönderilmiş olmamalıdır. Çalışmalarda yararlanılan araştırmaların ve yayınların, alıntılarının veya atıflarının bilimsel araştırma ilkelerine uygun olarak eksiksiz yapılması ve kaynakların belirtilmesi zorunludur. Çalışmada yer alan yazar sayısı birden fazla ise, yazarların çalışmaya bilimsel ve akademik olarak somut ve yeterli düzeyde katkı sağlaması beklenir. Çalışmaya ait tüm finansal destek kaynakları açıklanmalıdır. Olası çıkar çatışması durumlarını yayın kuruluna bildirmelidir.

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi'ne makale gönderen yazar/yazarların aşağıda belirtilen görevlere ve etik sorumluluklara uymalıdır.

3.1. Bildirim Standartları

- Yazar(lar)ın gönderdiği makale (araştırma, derleme veya kısa bildiri) özgün olmalıdır.
- Yazar(lar), çalışmanın önemine ilişkin tarafsız bir tartışma ile gerçekleştirilen araştırmayı net bir şekilde sunmalıdır.
- Yazar(lar), makalede verileri açık bir şekilde sunmalıdır.
- Yazar(lar)ın başka çalışmalardan faydalanması halinde tam ve doğru bir şekilde alıntı yapılmalıdır.
- Makale, diğer araştırmacıların çalışmayı tekrar edebilmesine olanak verecek şekilde yeterli detay ve kaynak içermelidir.
- Yazar(lar), etik dışı davranarak yanıltıcı ya da net olmayan ifadeleri makalelerinde kullanmamalıdır.
- Yazar(lar), dergi kurallarına uymadıkları ve belirtilen sürede aksiyon almadıkları sürece makalelerinin dergi tarafından yayımlanmayacağını bilerek hareket etmelidir.

3.2. Veri Ulaşımı ve Saklama

- Yazarlardan editöryal değerlendirme için makalelerini destekleyici araştırma verisi istenebilir.
- Yazarlar, değerlendirme sürecinde makalelerine ilişkin ham verilerin veya makalelerini destekleyecek verilerin talep edilmesi durumunda belirtilen verileri yayın kuruluna sunmaya hazır bulunmalıdırlar.

3.3. Orijinallik, İntihal ve Kaynakların Belirtilmesi

- İntihal, yazarın başka bir makaleyi kendi çalışması olarak göstermesi, kaynak göstermeden başka birine ait çalışmanın belli bölümlerinin kopyalanması ya da başka sözcüklerle anlatılması veya başkaları tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarının alınarak sunulması şeklinde olabilir. İntihalin her biçimi etik olmayan davranıştır ve kesinlikle kabul edilmemektedir. Yazarlar intihalden uzak durmalıdır. İntihal tanımı için [buraya](#) bakınız.
- Yazarlar çalışmalarının tümüyle orijinal olduğunu garanti etmelidirler. Yazarlar, başkalarının fikirlerini veya metinlerini kullanıyorsa mutlaka uygun şekilde kaynak ya da alıntı

göstermeliler ve gerekliyse izin almalıdırlar.

- Yazarlar kendilerine ait olan çalışmayı etkileyen ve çalışmaya ait uygun içeriğin oluşturulmasında katkısı olan tüm yayınları veya eserleri kaynak olarak göstermelidirler. Özel olarak (görüşme, yazışma ya da üçüncü taraflar ile tartışma) ile elde edilen bilgiler kullanılmamalı ya da kullanılacaksa izin alınarak bildirilmelidir.
- Yazarlar, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi'ne yayımlanmak üzere gönderdikleri makalelerini intihal tarama programları (iThenticate) ile taramalı ve dergipark sisteminde çevrim içi makale gönderim sırasında makalelerinin intihal içermediğine dair raporu yüklemek zorundadırlar.

3.4. Çoklu, Gereksiz ve Tekrar Yayınlama

- Aynı makale ile birden fazla dergiye başvuruda bulunmak etik olmayan bir davranıştır ve asla kabul edilmemektedir. Genel olarak, yazar daha önce basılmış bir yayını, özet formunda ya da yayınlanmış bir ders, akademik tez ya da elektronik ön baskının bir parçası olması dışında, değerlendirme için başka bir dergiye göndermemelidir.
- Yazarlar başvuru sırasında makaleyi başka bir dergiye daha aynı anda göndermediklerini garanti etmelidirler.
- Yazarlar, gönderilen yazının değerlendirme aşamasında olmadığını veya başka bir yerde yayımlanmak üzere kabul edilmediğini ve eğer kabul edilirse, aynı biçimde, başka bir dilde, elektronik ortam da dahil olmak üzere, yazarın yazılı izni olmaksızın başka bir yerde yayımlanmayacağını garanti etmelidir.

3.5. Yazar Katkıları

- Yazar katkıları, çalışmanın konseptine, tasarımına, gerçekleştirilmesine ya da yorumlanmasına önemli katkı sağlayan kişiler ile sınırlandırılmalıdır.
- Yazarlar, çalışmaya katkı veren yazarların listesini dikkatli bir şekilde hazırlamalıdır. Bazı durumlar eşyazar (co-author) olmayı bazı durumlar ise çalışmanın "Teşekkür" (Acknowledgement) bölümünde yer almasını hak edebilir.
- Sorumlu yazar, tüm eşyazarların çalışmada uygun şekilde yer aldığına, tüm eşyazarların çalışmayı görüp onayladıklarına ve yayımlanmak üzere başvuru yapılmasına dair verdikleri onaya ilişkin sorumluluğu üstlenmelidir.
- Sorumlu yazar, makaledeki tüm yazarların yazar sıralaması, çalışmanın kesinliği ve bütünlüğü gibi konularda fikir birliğinin sağlanmasından sorumludur ve orijinal başvuru sırasında kesin bir yazar listesi sunmalıdır.
- Çalışmanın başvurusu tamamlandıktan sonra, sadece istisna durumlarda, editör yazar listesinde ekleme, silme ya da yeniden düzenleme yapabilir. Tüm yazarlar bu şekilde yapılacak ekleme, silme ve yeniden düzenleme konusunda fikir birliği içinde olmalıdırlar. Tüm yazarlar çalışmanın ortak sorumluluğunu aldıklarını kabul ederler. Her yazar, uygun şekilde araştırılan ve karara bağlanan çalışmanın kesinliği ve bütünlüğü ile ilişkili sorulardan sorumludur.
- Sorumlu yazar, editör ile iletişime geçen kişi olarak Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi'ne makale ile birlikte "Yazar Katkı Formu"nun da doldurulup gönderilmesinden sorumludur.

3.6. Çıkar Çatışması Beyanı

- Yazarlar, çalışmalarını uygunsuz bir şekilde etkileyebilecek olarak gördükleri diğer kişi veya organizasyonlarla çıkar çatışması oluşturabilecek her türlü durum ve ilişkileri beyan etmelidirler.
- Sorumlu yazar, editör ile iletişime geçen kişi olarak Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi'ne makale ile birlikte "Çıkar Çatışması Beyanı Formu"nun da doldurulup gönderilmesinden sorumludur.

- Yazarlar çıkar çatışmalarının olduğu durumları mutlaka açıklamalıdır.

3.7. Temel Hataların Bildirimi

- Yazarlar, yayımlanmış, erken görünüm veya değerlendirme sürecinde olan bir çalışmada önemli bir hata ya da eksiklik fark ettiğinde, acil olarak dergi baş editörüne/yayınevine veya ilgili editöre bildirmek ve editör tarafından gerekli görülmesi durumunda makaleyi geri çekmek veya düzeltmek için editörle işbirliği yapmak ile yükümlüdür.
- Editör/yayınevi yayımlanmış olan makalenin bir hata içerdiğini üçüncü bir taraftan öğrenirse, editör ile işbirliği yapmak ve gerektiğinde destekleyici kanıt sağlamak yazarın yükümlülüğüdür.

3.8. Olası Riskler ve İnsan veya Hayvan Konuları

- Yazarlar, kullanımları sırasında olağan dışı risk yaratan kimyasallar, işlemler ya da malzemeler ile çalışmışlarsa açıkça belirtmelidirler.
- Eğer çalışmada hayvan ya da insan örnekleri/gönüllüler kullanılıyorsa, araştırmacılar tüm işlemlerin ilgili kanun ve kurumsal kılavuzlara uygun şekilde gerçekleştirildiğine ve uygun idari kurul tarafından bu işlemlerin onaylandığına ve Etik Kurul Onayı alındığına dair ifadenin makale içinde yer alması sağlanmalıdır.
- Yazarlar, Etik Kurul Onayının zorunlu olduğu çalışmalarda, etik kurul onayı alınan kurumun adı ve etik kurul onay numarasını, gereç ve yöntem kısmında ve Etik Kurul Onay bölümünde belirtmelidirler. Ayrıca, kullanılan protokol ve prosedürlerin etik olarak gözden geçirildiğini ve onaylandığını, makalenin gereç ve yöntem bölümüne eklemelidirler.
- Etik kurul raporu alınması gerektiği halde, etik kurul raporu olmayan çalışmalar reddedilecektir.
- İnsanlar veya insandan elde edilen örnekler üzerinde yapılan klinik araştırmalarda bilgilendirilmiş onam formu mutlaka alınmış olmalıdır ve gereç ve yöntem kısmında belirtilmelidir. İnsan gönüllüleri ile yapılan araştırmalar için araştırma protokolüne uygun olarak hazırlanmış yazılı bilgilendirilmiş gönüllü onam formu alınmalıdır.
- Yazarlar, çalışmalarında, hayvan ya da insan örnekleri/gönüllüler kullanmışsa gerekli etik kurul izinlerini aldığından emin olmalıdır. Etik kurul izin ifadesini makalede mutlaka belirtmelidir.
- Bu anlamda yazarlar aşağıda sıralanmış olan kılavuzlara uyarak çalışmalarını gerçekleştirmiş olmalıdır:

İnsanlar üzerinde gerçekleştirilen tüm araştırmalar Helsinki Bildirgesi ilkelerine göre yapılmalıdır ([World Medical Association \(WMA\) Helsinki Declaration for Medical Research in Human Subject](#)). İnsan gönüllülerinden bilgilendirilmiş onam formu alınmış olmalıdır. Tüm hayvan çalışmaları ARRIVE kılavuzuna uygun olmalı ([Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments \(ARRIVE\) Guidelines](#)) ve “Bilimsel Amaçlı Kullanılan Hayvanların Korunmasına İlişkin Konsey Direktifi”ne (EU Directive 2010/63/EU for animal experiments), “Birleşik Krallık Hayvan Yasası”na (The U.K. Animals (Scientific Procedures) Act 1986) ve/veya “U.S. İnsan Bakımı ve Laboratuvar Hayvanlarının Kullanımına İlişkin Halk Sağlığı Hizmeti Politikası” rehberine (U.S. Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals) uygun şekilde yürütülmelidir. Bitkiler ile ilgili tüm deneysel araştırmalar, uluslararası yönergelere uygun olmalıdır.

4. Ücret Politikası

- Hiçbir ad altında yazar veya kurumundan ücret alınmaz.
- Dergi ile işleme ve yayınlama ücretsizdir. Gönderilen veya kabul edilen makaleler için makale işleme ücreti veya gönderim ücreti yoktur.

Publication Terms

1. The Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University (J. Fac. Pharm. Ankara) is an open-access, peer reviewed journal and is published three times (January-May-September) a year.
2. The Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University publishes articles in every field of Pharmaceutical Sciences. The manuscript to the journal should not be published previously as a whole or in part and not be submitted elsewhere. Manuscript should be written in Turkish or in English. The experiments used have to be adhered to the Declaration of Helsinki for humans and European Community Guidelines for animals. In studies where Ethics Committee Approval is mandatory, the name of the institution from which ethics committee approval was obtained and the ethics committee approval number should be stated in the material and method section and the Ethics Committee Approval section, and the relevant document should be uploaded during article submission.
3. All manuscripts will be submitted to a review process by the editors and by qualified at least 2 outside reviewers. The article evaluation process of Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University is carried out on the principle of double-blind refereeing.
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, authors must send the copyright of the article to the Publisher by filling out the "Copyright Transfer Form".
6. Manuscript will be controlled using plagiarism checker. Articles sent to Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University for publication must be scanned with plagiarism scanning programs (iThenticate) and a report stating that the articles do not contain plagiarism must be uploaded during online article submission.
7. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University does not have an article publication fee (APC) or subscription fee.
8. The following types of articles are accepted in the Journal Faculty of Pharmacy of Ankara University:
 - a) **Original articles:** Articles written in English or Turkish in scientific format presenting original research. Articles should be printed on A4 size papers not exceeding 25 pages (including tables and figures). Research articles are expected to be innovative and contributing to science. Articles must have the main headings specified in the writing rules and must be prepared using a Windows compatible program.
 - b) **Review articles:** 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 30 pages (including tables and figures). Articles must have the main headings specified in the writing rules and must be prepared using a Windows compatible program.
 - c) **Short communications:** Rapid announcement of the results of a continuing research written in English or Turkish, no longer than 5, A4 size pages. Articles must have the main headings specified in the writing rules and must be prepared using a Windows compatible program.

Preparation of Manuscript

1. Texts must be written in A4 norm (21 x 29.7 cm).
2. Texts should be written with 1 line spacing, with 2.5 cm margins on the left and right sides of the A4 norm page, 3 cm margins each from the top and bottom edges (3 line spacing from the top on the first page). Articles accepted for publication will be directly uploaded to the system as a "Microsoft Word" file (online submission). The main text font should be **"Times New Roman"** and **11 pt.**
3. Page numbers **should not be specified** in the article.
4. Paragraph headings must **begin 1 cm inside**. Additional spaces should not be left between paragraphs.
5. On the title page, the title of the manuscript the name/s, the full address/es and ORCID no of the author/s, and the full address, telephone number, e-mail address of the corresponding author should be written and all should be centered in the text. It should be indicated by placing (*) above the surname of the corresponding author. Name, surname, full address, telephone number and e-mail address of this person should be specified at the bottom of the title page.
6. **Author's Name (first letter capital, others lowercase)** and **SURNAME (all capital letters)** should be written in bold, three lines spaced under the title, and without a title underneath. If there is more than one author, they should be written by separating them with a comma and leaving a space. The numbers to be placed on the surnames of the authors and the institution names and postal addresses (For example: Ankara University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, 06560, Ankara, Turkey) should be clearly written on the line just below the names.
 - **ORCID ID number must be declared for all authors.** ORCID IDs of the authors should be created by creating a hyperlink to the relevant logo and adding URL links.
7. International abbreviations may be used. ml for milliliter in the text; min. for minutes It should be written as specified.
8. Units should be expressed using the metric system.
9. All tables and figures should be placed in their places in the text without exceeding the writing area.
10. Tables should be numbered on the top, figures (formula, graph, chart, spectrum, chromatogram, photograph, etc.) should be numbered below with Arabic numbers (**Figure 1., Table 2.**) and should be included in the text. The words "Table", "Figure" and their numbers should be written in bold and in 11 pt. Figure/Picture (**in JPEG format**) must be placed in the article and pictures must be at least **300 dpi or in higher resolution**. Authors must obtain written permission to reproduce any images from other sources.
11. **Table** titles should be written in 11 font size justified on the top of the tables and not exceeding their width. If there is an explanation for the table, it should be written in 9 font size at the bottom of the table. The text in the table can be written between 8-11 points. **Figure titles** should be written at the bottom of the figures with a line spacing, centered and 11 pt. There must be **6 nk** space between the figure and figure title. There should be **18 nk** space between the text and title of figure and/or table.

See for below examples for tables:

 - All row and column lines should be included.
 - Table design should be uniform and straight throughout the article, no coloring / shading should be used.
 - Headings in the table should be written in **bold**. There must be **6 nk** space between the table and table title.

Table 1. Morphological characteristics of the species

Plant part*	<i>C. nummularia</i>	<i>C. integerrimus</i>
Leaf	Broadly elliptical-orbicular, 0.9-2.5-(4) x 0.5-2.5-(3-5) cm	From orbicular to ovate, 1.2-(4-5) x 0.9-3 cm,
Seed	3.5-4 x 1-2 mm, dark brown	3-4 x 1.5-2 mm, light brown

* Explanation should be 9 font size, 1 range.

Table 2. Patient demographics

Demographics	Group A*	Group B	Group C
Male gender	10 (%30)	20 (%60)	10 (% 30)
Cigarette consumption	20 (%60)	10 (%30)	20 (%60)

* Explanation should be 9 font size, 1 range.

Example for figure:



Figure 1. General view of *C. Nummularia* (The font size must be 11 pt with 1 line spacing and “Times New Roman” font, and must be centered in the text)

12. The sections of the articles should be prepared in accordance with the **TITLE** (Turkish and English), **ABSTRACT**, **INTRODUCTION**, **MATERIAL AND METHOD**, **RESULT AND DISCUSSION**, **ACKNOWLEDGEMENTS** (if available), **AUTHOR CONTRIBUTIONS**, **CONFLICT OF INTEREST**, **ETHICS COMMITTEE APPROVAL** (if available) and **REFERENCES**. Titles expressing these sections (except the first title of the article) should be written in **12 pt, bold capital letters and starting from the left of the page. There should be 18 nk space before and 6 nk space after the INTRODUCTION.** For, there should be 12 nk space before and 6 nk space after the other titles. Between the chapter titles and the text, a separate space **should not be left** other than the specified in this document.

- **TITLE:** Capital letters and **first title** in Turkish and English (Turkish title is the first title in Turkish articles, English title is the first title in English articles), **14 pt, bold** and the second title should be written in 12 pt, *italic*. The title should be appropriate to the text, short, introducing the work and clearly worded.
- **ABSTRACT** and **ÖZ:** It should be written in English (**ABSTRACT**) and Turkish (**ÖZ**) at the beginning of the articles, not exceeding 200 words, 10 pt, *italic* and within a frame. In articles written in a foreign language, first **ABSTRACT** and then **ÖZ** in Turkish. **ABSTRACT** and **ÖZ** titles should be written in 12 pt. And bold and the summary of the article should be presented as subheadings. Each subtitle should be written in 10 pt, bold, normal and 1 cm indented. **ABSTRACT** and **ÖZ** should be written in blocks with 1 cm margins from the right and left.

For original articles;

Subheadings to be used for **ABSTRACT**:

Objective: *Text should be written in italic.*

Material and Method: *Text should be written in italic.*

Result and Discussion: *Text should be written in italic.*

Keywords:

Subheadings to be used for **ÖZ**:

Amaç: *Text should be written in italic.*

Gereç ve Yöntem: *Text should be written in italic.*

Sonuç ve Tartışma: *Text should be written in italic.*

Anahtar Kelimeler: *Text should be written in italic.*

For review articles;

Subheadings to be used for **ABSTRACT**:

Objective: *Text should be written in italic.*

Result and Discussion: *Text should be written in italic.*

Keywords:

Subheadings to be used for **ÖZ**:

Amaç: *Text should be written in italic.*

Sonuç ve Tartışma: *Text should be written in italic.*

Anahtar Kelimeler:

- **Keywords (Anahtar Kelimeler):** It should consist of a minimum of 3 words, should be written alphabetically, italic in the relevant language, with only the first letter of the first keyword capitalized (except for abbreviations using capital letters) with commas between them and a spelling mark **should not be** used after the last keyword.
- **TEXT:** The text part of the original Turkish article should consist of 3 main headings: **INTRODUCTION, MATERIAL AND METHOD, RESULT AND DISCUSSION**. All of these main headings should be written in 12 pt, **capital letters** and bold. In review articles, there should be the main headings of **INTRODUCTION** and **RESULT AND DISCUSSION**, other titles should be written with the first letter of each word capital, the others in lowercase and bold, as determined by the author. Subheadings should be written in 11 font size, 1.5 line spacing, **bold** and aligned to the left. Numbering system **should not be** used in subheadings.
- **INTRODUCTION:** There should be a section containing the purpose of the research and studies on the subject.
- **MATERIAL AND METHOD:** Required information about the method should be clearly stated by indicating the material used. **Characterization of compounds** should be shown in a separate paragraph and clarification of the purity and structure of the new compounds should be provided. If animal or human samples/volunteers are used in the study, researchers should ensure that a statement stating that all procedures are carried out in accordance with the relevant laws and institutional guidelines and that these procedures have been approved by the appropriate administrative committee and that the approval of the Ethics Committee is included in the study. In studies for which Ethics Committee approval is mandatory, the name of the institution for which the ethics committee approval was obtained and the ethics committee approval number should be specified in the materials and methods section. It should also be included in the materials and methods section of the article that the protocols and procedures used are ethically reviewed and approved. For detailed information, please visit <http://journal.pharmacy.ankara.edu.tr/en/ethical-principles-and-publication-policy/> web page.

- **RESULT AND DISCUSSION:** This is the section where findings are given and evaluated.
 - If the author wishes, "Conclusion" can be added as the last paragraph of the RESULT AND DISCUSSION section. The font size must be 11 pt with 1 line spacing and “Times New Roman” font and the first letter must be uppercase and the other letters must be lowercase.
- **ACKNOWLEDGMENTS:** If any, the organization supporting the research and the people who contributed can be acknowledged briefly in this section prior to the Authors' Contribution.
- **AUTHOR CONTRIBUTIONS:** Contribution of the authors in the article should be written just before the conflict of interest notification, in accordance with the *Copyright Transfer Agreement* signed by the authors. Please use the initials of the authors for this notice instead of the full name and surname as in the example below. If there is not any author contribution for the specified sections, “-” should be added. Please see below example for writing author contributions.

Example:

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept: İ.Y., M.M.H., C.H., K.B.; Design: İ.Y., C.H., I.Ö.G., Ö.Ü.; Control: C.H., I.Ö.G., M.M.H., K.B.; Sources: Ö.Ü., Z.K., K.B., M.M.H., A.K., İ.A., G.A.G., B.G., B.K.; Materials: I.Ö.G., B.E., G.A.G., B.K., D.Ç.P.; Data Collection and/or Processing: A.K., Ö.Ü., M.K., A.S., D.Ç.P., T.C.Ş.T.; Analysis and/or Interpretation: Ö.Ü., B.G., T.C.Ş.T., E.K.S.; Literature Review: B.K., D.Ç.P., B.G., B.E.; Manuscript Writing: A.K., İ.A., T.C.Ş.T.; Critical Review: İ.Y., B.G., Ö.Ü., İ.A.; Other: -

- **CONFLICT OF INTEREST**

If there is a conflict of interest, it should be clearly declared in what form it is. If not, "The authors declare that there is no real, potential, or perceived conflict of interest for this article." They should use the expression.

- **ETHICS COMMITTEE APPROVAL**

If the ethics committee approval is obtained before the sources at the end of the study, the approval number must be specified from which institution and when it was obtained. Approval from the ethics committee should be uploaded during the manuscript submission. In studies that do not require ethics committee approval, the following sentence should be written.

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

- **REFERENCES:** Bibliography style is according to the American Psychological Association (APA). Typeface "Times New Roman" and 10 font size, "1" spacing, justified. In the text, it should be numbered in square brackets according to the order of appearance, such as: [1,6,9], [5-7] and listed according to these numbers at the end of the text. Reference should not be given next to the subtitles. If it is necessary to provide a source in the table, it should be specified as given in the text. References should be written in accordance with the examples below.
 - **For the article:** Author's surname, the initials of the name (There should be a period after the initial letter of each name of the author with more than one name, and there should not be a space in between. **There should not be “and” between the last author and the previous author. The “&” symbol should not be used.** The full title of the article should be written as the name of the journal, volume number, if available, the number (in parentheses), the beginning and ending page number (or article id), the year after the author names (in parentheses). **If there is more than one author, all of them should be written.** While writing the name of the article, the first letter of the first word should be capitalized

and the first letter of the other words should be written in lowercase. Journal names given in references should be written clearly without abbreviation.

Add the **[CrossRef]** sign at the end of each reference and enter the DOI number as a **hyperlink with the right click in the format below. Please do not add CrossRef hyperlink if the article is not listed at <https://www.crossref.org/>.**

[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90403-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90403-6)

Examples:

1. Martinez, M.J.A., Del Olmo, L.M.B., Benito, P.B. (2005). Antiviral activities of polysaccharides from natural sources. *Studies in Natural Products Chemistry*, 30, 393-418. **[CrossRef]**
2. Bahiense, J.B., Marques, F.M., Figueira, M.M., Vargasa, T.S., Kondratyuk, T.P., Endringer, D.C., Scherer, R., Fronzaa, M. (2017). Potential anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of *Sambucus australis*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 991-997. **[CrossRef]**

• **Online articles:**

Example:

Perneger, T.V., Giner, F. (1998). Randomized trial of heroin maintenance programme for adults who fail in conventional drug treatments. *British Medical Journal*, 317. Retrieved August 12, 2005, from <http://www.bmj.com/cgi/content/full/317/7150/>

• **Web sites:**

Example:

Clinical Pharmacology Web site. (2001). Retrieved June 16, 2004, from <http://cpip.gsm.com/>. Accessed date: 14.03.2021.

- **Books:** The surname of the author, the initials of the name, the name of the book, volume number (if any), the bookstore, the city where it was published, the page number, the year it was published (in parentheses) should be written.

Example:

Franke, R. (1984). *Theoretical Drug Design Methods*, Elsevier, Amsterdam, p.130.

- **Book chapters:** Author's surname, initials of the name, the title of the section, the editor / editors' surname, the initials of the name, the phrase (Ed./Eds.), The title of the book, if any, the book house, the city where it was published, the page number, the year it was published (in parentheses) should be written.

Example:

Weinberg, E.D. (1979). Antifungal Agents. In: M.E. Wolff and S.E. Smith (Eds.), *Burger's Medicinal Chemistry*, (pp. 531-537). New York: John Wiley and Sons.

- **For the thesis:** The surname of the author, the initials of the name, the year should be written (in parentheses) after the author's names and a full stop. After specifying the type of thesis, the title of the thesis and where it was made should be written.

Example:

Ahmed, J. (2008). PhD Thesis. *Pharmaceutical Botany investigations on Prangos Lindl. (Umbelliferae) growing in Konya province*. Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Ankara University, Ankara, Turkey.

- **For patent:** The surname of the author, the initials of the name, the year should be written (in parentheses) after the author's names and a full stop. The title and number of the patent should

be indicated.

Example:

Mahoney, S., Molz, L., Narayan, S., Saiah, E. (2018). Heteroaryl RHEB Inhibitors and Uses Thereof. WO 2018/191146 A1.

ETHICAL PRINCIPLES AND PUBLICATION POLICY

Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University is an open-access, peer-reviewed journal and a publishing medium for original research, reviews and short communications covering important developments in the field of pharmaceutical sciences in Turkish or English. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University does not have an article publication fee (APC) or subscription fee.

As the editorial board, it is aimed to publish high-quality new studies that make a significant contribution to the scope of the journal. To achieve this goal, articles submitted are subject to initial evaluation by the editor-in-chief and/or assistant editors to ensure that they meet the scientific and formal criteria to be published in the journal. Only studies that pass this preliminary evaluation process are continued to other stages for further evaluation.

Preliminary Assessment

- The scientific quality and novelty of the study must be sufficient to be published in the journal.
- Studies submitted to the journal must comply with the purpose and scope of the journal.
- The text must be written in English or Turkish, grammatically and scientifically well-written.
- The similarity rate of studies submitted to the journal should not exceed 20%.
- Studies should be arranged in accordance with the journal's writing rules and template.
- Copyright transfer form, ethics committee approval document and author contribution form must be uploaded and signed.
- Studies must be sent to the journal via the electronic online application system.

The further evaluation process of studies that do not meet these qualifications cannot be initiated.

Journal editors, reviewers and authors have certain responsibilities during the journal publication process. These responsibilities are explained below.

1. Editor's Duties and Ethical Responsibilities

The editor can independently decide which of the articles sent to the journal should be published, or can also consult with members of the editorial board or reviewers. Within the framework of the journal's ethical principles and publication policy, it is responsible for carrying out the preliminary evaluation, peer review and publication stages of the studies in an impartial, auditable, fair, independent of conflict of interest and in accordance with confidentiality principles. If there is no violation in terms of publication policy and ethical principles, studies that comply with the purpose and scope of the journal should be taken to the preliminary evaluation stage.

The duties and descriptions of the editor-in-chief, associate editors, section editors and editorial advisory board are as follows:

Editor-in-Chief: Editor in chief has full authority over the publication of the journal content. Editor in chief works with Associate Editors, Section Editors and the Editorial Advisory Board.

Associate Editors: Associate Editors are primarily responsible for answering questions about the journal, making suggestions to the journal reviewers and board, and assisting the Editor-in-Chief during the article publication process.

Section Editors: Section Editors assist authors in assigning double-blind referees and answering questions about the journal.

Editorial Advisory Board: The Editorial Advisory Board guides the Editor-in-Chief and Associate Editors on issues related to the production of quality publications that are appropriate for the purpose of Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University.

1.1. Publication Policy

- The editor-in-chief is solely responsible for deciding which articles sent to the journal should be published. The editor's decision may be in line with the principles of the journal's editorial

board or is limited by applicable legal requirements regarding issues such as defamatory publication, copyright infringement and plagiarism.

- The editor-in-chief ensures that the authors fill out the "Copyright Transfer Form" and send the copyright of the article to the publisher before the article is published.
- The editor-in-chief ensures that the authors fill out the "Conflict of Interest Form" and the "Author Contribution Form" before the article is published.
- The editor-in-chief assigns associate editors to formally review the articles sent to the journal. Articles that do not comply with the rules of the Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University are rejected without being evaluated.

1.2. Publication Review

- The editor-in-chief is responsible for ensuring that the publication evaluation process is fair, impartial and timely.
- The editor generally ensures that all articles are evaluated by at least two external and independent reviewers. If necessary, the editor requests additional opinion from a third reviewer.
- The editor selects the reviewers by evaluating experts who are suitable for the scope of the article.
- The editor carefully reviews the publication process to evaluate and decide on disclosures made for possible conflicts of interest, "self-citation" suggestions made by reviewers, and any possibility of bias.
- The editor-in-chief/other editors requests for the article to be scanned by a similarity detection software (iThenticate) at any point during the peer review or evaluation/publication process, or they do it themselves. In this sense, even if the expressions or sentences are the author(s) themselves, the text should not have an unacceptable similarity to previously published data.
- If the editor-in-chief detects errors in an article before it is published, he/she corrects them. If he/she detects it later, then he/she has to publish the corrections. All corrections or retraction notices must be prominently published in the journal. It should also be listed on the contents page.
- Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University's editors follow the "[COPE Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors](#)" and "[COPE Best Practice Guidelines for Journal Editors](#)" guidelines published by the Committee on Publication Ethics (COPE).

1.3. Fair Evaluation

- Editor-in-Chief/other editors evaluates articles according to their scientific content, regardless of the authors' race, gender, sexual orientation, belief, ethnicity, citizenship or political views. The journal's editorial principles support transparent and completely honest review.
- The editor must ensure that reviewers and authors fully understand what is expected of them.
- The editor makes all his communication regarding the journal through the journal's electronic application system and follows a transparent and fair manner in case of objections to his decisions.

1.4. Privacy Policy

- The chief editor/other editors is obliged to maintain the confidentiality of all materials in the application to the journal and all communication with the reviewers (unless otherwise approved by the relevant authors and reviewers).
- The chief editor/other editors is responsible for protecting the identities and rights of the reviewers, unless the reviewers agree to their names being disclosed.
- Unpublished materials belonging to a submitted article should not be used for the editor's own studies/research without the written consent of the author.
- The chief editor/other editors must keep all information or ideas obtained during the article evaluation process confidential and should not use them for personal purposes.

2. Duties and Ethical Responsibilities of Referees

The article evaluation process of Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University is carried out on the principle of double-blind review. Therefore, reviewer cannot communicate with the author(s), evaluations are shared through the Dergipark management system. During the evaluation process, evaluation forms and reviewers' comments regarding the manuscripts are forwarded to the corresponding author through the editor. Reviewers must act in accordance with the principles of impartiality, confidentiality, objectivity and scientific review throughout the evaluation process. They must be an expert and competent in the relevant field. They must complete their report on the work submitted for evaluation within the specified time period. For reports that cannot be submitted on time, the editor should be contacted without delay. The editorial board should be informed in cases of copyright and/or ethical infringement, possible conflict of interest and plagiarism.

Reviewers who evaluate the manuscript of the Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University are expected to comply with the stated duties and ethical responsibilities describe below:

2.1. Contribution to Editorial Decisions

- Reviewers must evaluate the work submitted by authors constructively and appropriately.
- If the reviewers think that they are not competent to evaluate the research in the article or cannot complete it in sufficient time, they must notify the editor.
- Reviewers should not make harsh and personal criticisms towards the authors.
- When reviewers receive an invitation to evaluate an article, they should refuse to evaluate the article if they feel inadequate about the subject studied in the article.
- Reviewers must evaluate the article within the given time.
- Reviewers should only objectively evaluate the content of the study.

2.2. Privacy

- Reviewers must make the evaluation impartially and confidentially.
- Reviewers should not share their evaluations or information about the article with third parties.
- Reviewers must keep confidential the information, ideas and unpublished materials or studies obtained during the article evaluation process and must not use them for personal purposes.
- Reviewers should not retain or reproduce a copy of the article.

2.3. Detecting Ethical Issues

- Reviewers should notice the ethical problems in the article and bring them to the attention of the editor.
- If the reviewers detect that the article has been previously published elsewhere or that there is a significant similarity or overlap with a previously published article, they must notify the editor. Any previously published observations and/or arguments should be accompanied by the relevant reference.

2.4. Impartiality and Competition Standards

- Reviewers must make their evaluations impartially and free from bias. It is not appropriate to criticize the author as a person. Reviewers must express their opinions with supporting arguments.
- Reviewers must check for possible conflict of interest before agreeing to evaluate the article. If they feel they face a conflict of interest, they should refuse to review the manuscript and inform the editor.
- If reviewers claim that the reviewers' (or people working with the reviewers) work has been taken as a source by the author, they must provide real scientific justifications and be careful that this is not an attempt to increase the reviewers' number of references or the visibility of their work.

- Reviewers should not stay away from scientific reality when making their evaluations and should resort to citing sources if necessary.

3. Authors' Duties and Ethical Responsibilities

Articles submitted to Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University must not have been previously published in elsewhere or should not have been sent to another publication within the same time period for publication. It is mandatory that the quotations or citations of the research and publications used in the studies are made completely in accordance with the principles of scientific research and the sources are stated. If the number of authors in the study is more than one, the authors are expected to make a concrete and sufficient scientific and academic contribution to the study. All sources of financial support for the study must be disclosed. Authors must report possible conflict of interest situations to the editorial board.

The author(s) who sent articles to Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University, must comply with duties and ethical responsibilities listed below:

3.1. Notification Standards

- The article (research, review or short communication) sent by the author(s) must be original.
- The author(s) should clearly present the research performed with an unbiased discussion of the significance of the study.
- The author(s) must present the data clearly in the article.
- If the author(s) uses other works, they must cite them fully and accurately.
- The article must contain sufficient detail and sources to enable other researchers to replicate the study.
- Author(s) should not act unethically and use misleading or unclear expressions in their articles.
- Authors act with the knowledge that their articles will not be published by the journal unless they comply with the journal rules and take action within the specified time.

3.2. Data Transportation and Storage

- Authors may be asked for research data supporting their articles for editorial evaluation.
- Authors must be ready to submit the specified data to the editorial board in case raw data regarding their articles or data to support their articles are requested during the evaluation process.

3.3. Originality, Plagiarism and Citation of Sources

- Plagiarism may occur in the form of the author representing another article as his own work, copying or paraphrasing certain parts of someone else's work without citing the source, or presenting the results of work done by others. Any form of plagiarism is unethical behavior and is completely unacceptable. Authors should avoid plagiarism. Please click [here](#) for the definition of plagiarism.
- Authors must guarantee that their work is completely original. If authors use others' ideas or texts, they must indicate appropriate sources or citations and obtain permission if necessary.
- Authors must cite as references all publications or works that influence their work and contribute to the creation of appropriate content for the work. Information obtained privately (interview, correspondence or discussion with third parties) should not be used or, if used, should be reported with permission.
- Authors must scan the articles that they send to Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University for publication with plagiarism scanning programs (iThenticate) and upload a report stating that their articles do not contain plagiarism during online article submission in the Dergipark system.

3.4. Multiple, Redundant and Republishing

- Submitting to more than one journal with the same article is unethical behavior and is never accepted. In general, the authors should not submit a previously published publication to another journal for review, except in abstract form or as part of a published lecture, academic thesis, or electronic preprint.
- Authors must ensure that they do not submit the article to another journal at the same time during the submission.
- Authors must guarantee that the submitted manuscript is not under evaluation or has been accepted for publication elsewhere, and if accepted, it will not be published elsewhere in the same format, in another language, including electronic media, without the written permission of the author.

3.5. Author Contributions

- Author contributions should be limited to individuals who have made significant contributions to the concept, design, implementation, or interpretation of the work.
- Authors should carefully prepare the list of authors who contributed to the study. In some cases, the work may deserve to be a co-author, and in some cases, the work may deserve to be included in the "Acknowledgment" section.
- The corresponding author must take responsibility for ensuring that all co-authors are properly included in the work, that all co-authors have seen and approved the work, and that they have approved the submission for publication.
- The corresponding author is responsible for ensuring that all authors on the manuscript agree on issues such as author order, accuracy and integrity of the work, and must submit a definitive author list at the time of the original submission.
- After the application of the study is completed, the editor can add, delete or rearrange the author list only in exceptional cases. All authors must agree on such additions, deletions and rearrangements. All authors acknowledge shared responsibility for the work. Each author is responsible for questions relating to the accuracy and integrity of the work that have been properly researched and adjudicated.
- The corresponding author, as the person who contacts the editor, is responsible for filling out and sending the "Author Contribution Form" along with the article to Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University.

3.6. Conflict of Interest Declaration

- Authors must declare any situations or relationships that may create a conflict of interest with other individuals or organizations that they deem to be inappropriately influencing their work.
- The corresponding author, as the person who contacts the editor, is responsible for filling out and sending the "Conflict of Interest Declaration Form" along with the article to Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University.
- Authors must disclose situations where they have conflicts of interest.

3.7. Reporting Basic Errors

- When authors notice a significant error or omission in a published work that is in the early review or evaluation process, they are obliged to immediately notify the journal editor-in-chief / publisher or the relevant editor and, if deemed necessary by the editor, cooperate with the editor to withdraw or correct the article.
- If the editor/publisher learns from a third party that the published article contains an error, it is the author's obligation to cooperate with the editor and provide supporting evidence where necessary.

3.8. Potential Risks and Human or Animal Issues

- Authors should clearly state if they have worked with chemicals, processes, or materials that pose unusual risks when used.
- If animal or human samples/volunteers are used in the study, researchers should ensure that a statement is included in the article that all procedures were carried out in accordance with the relevant laws and institutional guidelines and that these procedures were approved by the appropriate administrative board and Ethics Committee Approval was obtained.
- In studies where Ethics Committee Approval is mandatory, authors must indicate the name of the institution from which ethics committee approval was obtained and the ethics committee approval number in the materials and methods section and the Ethics Committee Approval section. They should also include in the materials and methods section of the manuscript that the protocols and procedures used have been ethically reviewed and approved.
- Although an ethics committee report is required, studies without an ethics committee report will be rejected.
- In clinical research conducted on humans or samples obtained from humans, an informed consent form must be obtained and must be stated in the materials and methods section. For research conducted with human volunteers, a written informed consent form prepared in accordance with the research protocol must be obtained.
- Authors must ensure that they obtain the necessary ethics committee permissions if they use animal or human samples/volunteers in their studies. Ethics committee permission must be stated in the article.
- In this sense, authors must have carried out their work by following the guidelines listed below: All research conducted on humans should be conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki ([World Medical Association \(WMA\) Helsinki Declaration for Medical Research in Human Subject](#)). Informed consent must have been obtained from human volunteers. All animal studies must comply with the ARRIVE guideline ([Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments \(ARRIVE\) Guidelines](#)) and the “Council Directive on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes” (EU Directive 2010/63/EU for animal experiments), “United Kingdom Animal (The U.K. Animals (Scientific Procedures) Act 1986) and/or “U.S. It must be conducted in accordance with the U.S. Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals. All experimental research on plants must comply with international guidelines.

4. Fee Policy

- No fee is charged from the author or his institution under any name.
- Processing and publishing with the journal is free. There are no article processing fees or submission fees for submitted or accepted articles.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ DERGİSİ

YAYIN SAHİBİNİN ADI : Prof. Dr. Asuman BOZKIR
SORUMLU YAZI İŞLERİ MÜDÜR ADI : Prof. Dr. Asuman BOZKIR
YAYIN İDARE MERKEZİ ADRESİ : Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Dekanlığı, 06560 Yenimahalle/Ankara
YAYIN İDARİ MERKEZİ ADRESİ TEL : 0 (312) 203 30 01
YAYIN TÜRÜ : Bilimsel Periyodik Elektronik Dergi, Yılda 3 Sayı

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



ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ DERGİSİ
(Ankara Ecz. Fak. Derg.)

JOURNAL OF FACULTY OF PHARMACY OF ANKARA UNIVERSITY
(J. Fac. Pharm. Ankara)

Cilt / Vol: 49
Sayı / Issue: 1
Yıl / Year: 2025

Ücretsizdir