

**MATRİN VE OKSİMATRİNİN MİKROBİYAL TRANSFORMASYONU
VE METABOLİTLERİNİN KOLİNESTERAZ İNHİBİSYONU**

Ecz. Ayşe Esra KARADAĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Farmakognozi Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mayıs, 2017

Bu Tez Çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1601S029 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ayşe Esra KARADAĞ' ın “Matrin ve Oksimatrinin Mikrobiyal Transformasyonu ve Metabolitlerinin Kolinesteraz İnhibisyonu” başlıklı tezi 22/05/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognози Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Üye (Tez Danışmanı)

Unvanı- Adı Soyadı

: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

Üye

: Prof. Dr. Neşe KIRIMER

Üye

: Prof. Dr. Ahmet ÇABUK

İmza





ÖZET

MATRİN VE OKSİMATRİNİN MİKROBİYAL TRANSFORMASYONU VE METABOLİTLERİNİN KOLİNESTERAZ İNHİBİSYONU

Ecz. Ayşe Esra KARADAĞ

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mayıs, 2017

Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

Mikrobiyal transformasyon; farklı mikroorganizma ya da bu mikroorganizmaların enzimlerinin kullanılmasıyla belirli substratların yeni metabolitlere dönüştürülmesi için kullanılan biyoteknolojik yöntemlerdendir. Bu yöntem sağladığı avantajlardan dolayı kimya, gıda ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yeni doğal maddelerin keşfi ve üretimi amacıyla farmakognozi biliminde de ilgi çekmektedir.

Halk arasında acı meyan/acı piyan olarak bilinen, Fabaceae familyası üyelerinden *Sophora* türlerinde sekonder metabolit olarak bulunan matrin ve oksimatrin, kinolizidin alkaloidleri grubundadırlar. Matrin ve oksimatrinin; kardiyak iskemi, viral hastalıklar, hepatit B, kanser gibi hastalık ve semptomlar üzerinde çalışmaları mevcuttur.

Bu çalışmada, matrin ve oksimatrin 30 farklı bakteri, maya ve fungus kullanılarak mikrobiyal biyotransformasyonu incelenmiştir. Matrin substratından *Mucor ramannianus* ve *Enterococcus faecalis* ile biyotransformasyonu sonucu yeni 2 metabolit oluşmuştur. Oksimatrin substratı ile 5 farklı mikroorganizma ile biyotransformasyonu sonucu matrin metabolit olarak elde edilmiştir. Önce ince tabaka kromatografisi (İTK) ile tespit edilen saflaştırılmış metabolitlerin yapısı sıvı kromatografisi/kütle spektroskopisi (SK/KS) ile kısmen aydınlatılmıştır. Metabolit ve substratların *in vitro* antibakteriyel, antikandidal, antienflamatuvar, anti-helikobakter, antitüberküloz özellikleri ve asetilkolinesteraz/butirilkolinesteraz inhibisyonu karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Test konsantrasyonlarında *in vitro* aktivite deneyleri sonucunda numunlerin kayda değer bir inhibisyona yol açmadığı ve etkinlikte olmadığı gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Matrin, oksimatrin, mikrobiyal transformasyon, antimikrobiyal etki, kolinesteraz aktivite

ABSTRACT

BIOTRANSFORMATIONS OF MATRINE AND OXYMATRINE AND THE CHOLINESTERASE ACTIVITY OF METABOLITES

Pharm. Ayşe Esra KARADAĞ

Department of Pharmacognosy

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, May, 2017

Supervisor: Prof. Dr. Fatih DEMİRÇİ

Microbial transformations are green biotechnological processes where different microorganisms or their enzymes are used to produce new metabolites from defined substrates. This technique has been utilized in chemical, food and pharmaceutical industries in recent years due to its advantages, also in pharmacognosy for the discovery and production of natural drugs.

Matrine and oxymatrine are members of the quinolizidine alkaloids, which naturally occur in *Sophora* species known as “acı meyan” or “piyan” of the Fabaceae as secondary metabolites. *In vitro* and *in vivo* studies with matrine and oxymatrine on cardiac ischemia, viral symptoms and hepatitis B, anticancer, *etc.* are reported.

In this present study, matrine and oxymatrine were subjected to microbial biotransformations by using 30 different bacteria, yeast, and fungi, respectively. The biotransformation of matrine by *Mucor rammanianus* and *Enterococcus faecalis* produced 2 new metabolites. in the isolation and characterization. Oxymatrine was biotransformed by 5 different microorganisms to produce matrine. The metabolites were initially identified by thin layer chromatography (TLC) and characterized by liquid chromatography/mass spectroscopy (LC/MS). Furthermore, the purified metabolites and substrates were subjected comparatively to *in vitro* antibacterial, anticandidal, anti-oxidant, antituberculosis evaluations and cholinesterase inhibition assays. All tested samples were not active at the tested concentrations and without significant inhibitory effects.

Keywords: Matrine, oxymatrine, microbial transformation, antimicrobial activity, cholinesterase activity

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında göstermiş olduğu sabır ve desteklerinden dolayı danışmanım Sayın Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye,

Bilgi ve tecrübeleri ile bana her zaman yol gösteren, deneysel çalışmalarımın her aşamasında ve diğer analizler sırasında yardım ve desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Neş'e KIRIMER'e,

Teknik ve idari bir sorunla karşılaştığım zamanlarda bilgi ve tecrübesi ile yanımda olan Sayın Prof. Dr. Betül DEMİRCİ'ye,

Deneylerime teorik ve pratik çözüm önerileri ve tecrübeleriyle her zaman katkıda bulunan Sayın Doç. Dr. Gökâl İŞCAN'a,

Biyotransformasyon deneylerini gerçekleştirirken karşılaştığım tüm sorunlarda bana yardımcı olan Gamze GÖĞER, Ceren ELMACI ve Arş. Gör. Özge ÖZŞEN'e,

Aktivite deneylerinde yardım ve katkılarını gördüğüm değerli arkadaşlarım Nursenem KARACA ve Zeynep ÇOBAN'a,

Desteklerini her zaman gördüğüm arkadaşlarım Arş. Gör. Gözde ÖZTÜRK, Görkem ŞENER ve tüm Farmakognozi Anabilim Dalı mensuplarına,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü İdaresi ve personeline, ayrıca maddi desteklerinden dolayı Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na (Proje No:1601S029),

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu çalışmam boyunca da sonsuz desteğini esirgemeyen, sabır ve anlayış gösteren eşim Muhammet KARADAĞ'a, bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Ecz. Ayşe Esra KARADAĞ

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarda bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Ecz. Ayşe Esra KARADAĞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	3
2.1. Alkaloidler	3
2.2. Kinolizidin Grubu Alkaloidler, Biyolojik Aktiviteleri ve Özellikleri	4
2.3. Matrin (1) ve Oksimatrin (2) in Özellikleri ve Biyolojik Aktiviteleri	6
2.3.1. Matrin (1).....	6
2.3.2. Oksimatrin (2).....	7
2.4. Matrin (1) ve Oksimatrin (2) in Mikrobiyal Transformasyonu.....	7
2.5. Matrin (1) ve Oksimatrin (2) in Biyotransformasyonu ile İlgili Yapılmış Çalışmalar.....	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	10
3.1. Materyal.....	10
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	10
3.1.2. Kullanılan sarf malzemeleri.....	11
3.1.3. Kullanılan aletler ve cihazlar.....	11
3.1.4. Biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmalar.....	11
3.1.5. Antimikrobiyal aktivite testi için kullanılan mikroorganizmalar.....	12
3.1.6. Test maddelerinin analiz koşulları.....	13
3.2. Yöntem.....	13
3.2.1. Biyotransformasyon çalışmaları.....	13
3.2.1.1. Mikroorganizmaların temini ve saklanması.....	13

3.2.1.2. Besiyerlerinin hazırlanması.....	14
3.2.1.3. Ön tarama deneyleri.....	14
3.2.1.4. Preparatif ölçekli biyotransformasyon.....	16
4. BULGULAR.....	17
4.1. Ön Tarama Çalışmaları Sonucunda Oluşan Metabolitler	17
4.1.1. Metabolitlerin saflaştırılması ve yapı tayinleri	18
4.2. Biyolojik aktivite çalışmaları.....	19
4.2.1. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi	19
4.2.1.1.Mikrodilüsyon yöntemiyle aktivite belirlenmesi.....	19
4.2.2. Kolinesteraz inhibisyonunun belirlenmesi	22
4.2.3. Antienflamatuar aktivitenin belirlenmesi	26
5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	28
KAYNAKLAR	30
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Kinolizidin alkaloidlerinin sahip olduğu bazı biyolojik aktiviteler.....	6
Tablo 2.2. Matrin (1) ve oksimatrin (2) in fizikokimyasal özellikleri.....	8
Tablo 3.1. Biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmalar.....	12
Tablo 3.2. Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar.....	12
Tablo 4.1. Ön tarama deneyleri sonucu oluşan metabolitler.....	18
Tablo 4.2. Numunelerin (mg/mL) ve antimikrobiyallerin (μ g/mL) mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	21
Tablo 4.3. Asetilkolinesteraz inhibisyonu sonuçları.....	26
Tablo 4.4. Butirilkolinesteraz inhibisyonu sonuçları.....	26
Tablo 4.5. Numunelerin 5-LOX % inhibisyon değerleri (mg/mL).....	27

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Matrin (1) ve oksimatrin (2) in bitkisel kaynakları.....	2
Şekil 2.1. Kinolizidin alkaloitlerin yapısal grupları.....	4
Şekil 2.2. Kinolizidin alkaloitlerinin biyosentezi.....	5
Şekil 4.1. Matrinden biyotransformasyon sonucu oluşan metabolitler.....	17
Şekil 4.2. <i>M. smegmatis</i> suşuna karşı numunelerin MİK değerleri.....	22
Şekil 4.3. <i>M. fortuitum</i> suşuna karşı numunelerin MİK değerleri.....	22
Şekil 4.4. <i>M. avium</i> suşuna karşı numunelerin MİK değerleri.....	22
Şekil 4.5. Ellman metodu reaksiyon mekanizması.....	25

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

μg	: Mikrogram
A.	: Aiton
AChE	: Asetilkolinesteraz
ACN	: Asetonitril
ATCC	: American Type Culture Collection (Amerikan tip kültür koleksiyonu)
ATCI	: Asetiltiyokolin iyodür
atm	: Atmosfer
BChE	: Butirilkolinesteraz
BTCI	: Bütiriltiyokolin iyodür
CAS	: Chemical Abstracts Service
CHCl₃	: Kloroform
CLSI	: Klinik ve Laboratuar Standartları Enstitüsü
CO₂	: Karbon dioksit
CYPA4	: Cytochrome P450
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DTNB	: 5-5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)
EC	: Enzim Komisyonu
ESOGÜ	: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
EtOAc	: Etil asetat
eV	: Elektrovolt
g	: Gram
GK	: Gaz Kromatografisi
IC₅₀	: Inhibitory concentration of 50% (Enzimin %50'sini inhibe eden konsantrasyon)
IL-6	: İnterlökin-6
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
KK	: Kolon Kromatografisi
KS	: Kütle Spektroskopisi

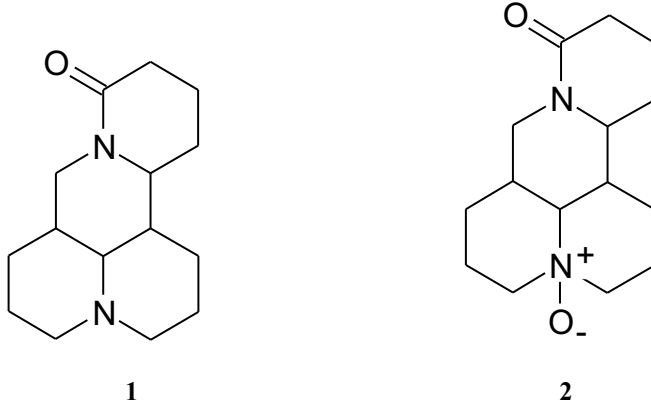
L	: Litre
L.	: Linnaeus
LOX	: Lipooksijenaz
LPS	: Lipopolisakkarit
m	: Metre
M.Ö.	: Milattan önce
MCF	: Michigan Cancer Foundation
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
MHA	: Mueller Hinton Agar (katı besiyeri)
MHB	: Mueller Hinton Broth (sıvı besiyeri)
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Na₂SO₄	: Sodyum sülfat
NaCl	: Sodyum klorür
NDGA	: Nordihidroguairatik asit
nm	: Nanometre
NRLL	: Norsk Radio Relæ Liga
°C	: Santigrat derece
PDA	: Potato Dekstroz Agar (katı besiyeri)
pH	: Power of Hydrogen
rpm	: Rotation per minute (dakikadaki rotasyon)
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute (sıvı besi ortamı)
SGA	: Sabouraud Glikoz Agar (katı besiyeri)
SK	: Sıvı Kromatografisi
TNF	: Tümör nekroz faktör
UV	: Ultraviyole
vb.	: ve benzeri
YBSK	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
µL	: Mikrolitre

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Geçmişte tedavi amaçlı kullanılan materyaller bitkisel kaynaklardan ekstre edilmiştir. Daha sonraları ilaçlar sentetik olarak üretilmiş ve daha kolay bir kullanıma sunulmuştur. Ancak son zamanlarda biyoaktif doğal bileşiklere olan ilginin tekrardan artmaya başladığı görülmektedir. Fakat göz önünde bulundurulması gereken en önemli husus, bitkilerden ekstre edilerek elde edilen doğal bileşiklerin miktarının oldukça düşük olduğudur. Bu bağlamda biyoteknolojik uygulamalarla, kimyasal yollarla istenildiği gibi üretilmeyen ya da doğal kaynaklardan izolasyonu ekonomik kısıtlamalar nedeniyle mümkün olmayan ilaç, aroma ve gıda katkı hammaddelerinin kolaylıkla sentezlenebilmesi ve üretilmesi mümkün olmuştur.

Mikroorganizmalar, sahip oldukları enzim sistemleri ile substratlara etki ederek buldukları ortamda çeşitli dönüşümlerin gerçekleşmesine imkân sağlamaktadır. Aktif halde bulunan suşların, sıvı besiyerlerinde substratla etkileşmesi sonucu elde edilecek metabolitler, substrattan daha aktif ve daha az toksik maddeler olabilmektedir. Mikrobiyal transformasyon çok eski zamanlardan beri kullanılagelen bir yöntemdir. Çeşitli mikroorganizmalarla fermentasyonlar ile elde edilen ürünler, M.Ö. 10.000'lerde Mezopotamyalılar ve Sümerler tarafından kullanılmaktaydı. Babil'de mayalama ile bira yapımının tarifini anlatan M.Ö. 6000'e ait bir kil tablete rastlanmıştır. 1864 yılında Pasteur *Acetobacter aceti* ile etanolü asetik asite dönüşümü göstermiştir. 1934 yılında ise biyotransformasyon teknolojisi efedrin üretiminde kullanılmıştır. Dahası, doğal olarak elde edilmesi zor olan pek çok bileşiğin üretiminde pratik bir yöntem olarak endüstriyel olarak kullanılmaktadır. Mikrobiyal transformasyon yöntemi ile doğal maddelerden yola çıkarak üretilen yeni bileşikler de doğal bileşikler olarak kabul görmektedir, bu doğrultuda farmakognozinin de ilgi alanına girmektedir (Dutta vd., 2001, s. 23).

Proje kapsamında substrat olarak kullanılacak maddeler olan matrin (**1**) ve oksimatrin (**2**), doğal olarak *Sophora* türlerinin köklerinden izole edilebilmektedirler. Bu maddeler kinolizidin alkaloidleri yapısında olup, çeşitli biyolojik ve farmakolojik etkilere sahiptirler (Kinghorn vd., 1984, s. 105). Sedatif, inotropik, antipiretik, antitümör etkileri ve Hepatit B üzerinde aktiviteleri kaydedilmiştir (Ma vd., 2008, s. 245; Zhang vd., 2006, s. 1055; Ding vd., 2006, s. 4748). Bunun yanı sıra matrin (**1**) in κ -opoid reseptörü ve μ -reseptör agonisti olduğu ve antinosiseptif aktivitesi olduğu bilinmektedir (Higashiyama vd., 2005, s. 845; Zhou vd., 2008, s. 931).



Klinik olarak oksimatrın (2) in matrin (1) den daha aktif olduğu bilinmektedir. Oksimatrın (2) in kalp aritmilerini düzenlediği çalışmalarda kayıtlıdır. Matrin (1), antiinflamatuvar etkili bileşiklerle kombine edildiğinde ekzama, psöriazis ve nörodermatitte kullanılmaktadır (Zhu vd., 2001, s. 44; Ding vd., 2002, s. 48).



Şekil 1.1. Matrin (1) ve oksimatrın (2)in bitkisel kaynakları; (a) Japon Soforası (*Sophora japonica* L.), (b) *S. flavescens* Aiton, (c) *Sophorae radix*

Asetilkolin beynin bellek bölgesindeki önemli bir nörotransmitterdir. Asetilkolinesteraz inhibitörleri Alzheimer Hastalığı'nın tedavisinde kullanılmaktadır. Vücuttaki asetilkolinesteraz enzimi inhibe edilerek Alzheimer Hastalığı'nda azalan en önemli nörotransmitter olan asetilkolinin sinaptik aralıkta konsantrasyonunun artmasını sağlar. Alzheimer hastalığının tedavisinde asetilkolinesteraz inhibitörleri çeşitli mekanizmalarla yararlı olabilir. Erken tedavi faydaları postsinaptik nöronların stimülasyonu ve presinaptik hücrelerden nörotransmitter salınımını arttırarak olur. Asetilkolin miktarını arttırmak nöronların genel aktivitesini arttırarak nöroprotektif etki oluşturabilir (Mega vd., 2001, s. 65). Dahası, nöronal aktivasyonu ve nörotransmisyonu arttırarak Alzheimer hastalığı patofizyolojisinden sorumlu olan proteinlerin degradasyonlarını da arttırdıkları bilinmektedir (Franchis vd., 1999, s. 141).

Bu proje çalışmanın amacı; bitkilerde alkaloit yapısındaki matrin ve oksimatrin substratlarından biyotransformasyon ile elde edilecek yeni metabolitlerin tanımlanması ve substrat/metabolit biyoaktivitelerinin *in vitro* kolinesteraz inhibisyonu, antimikrobiyal etki (Gram-pozitif ve -negatif bakteri, *Candida*, *Mycobacterium*) açısından karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesidir.

Amaca uygun olarak çalışmamızda substrat olarak kullanılacak olan matrin (1) ve oksimatrin (2) bileşiklerinin mikrobiyal transformasyon yolu ile doğal türevleri sentezlenmesi ve biyolojik aktiviteleri incelenmesi hedeflenmiştir. 30 farklı mikroorganizmanın sıvı besiyerinde üretilmesinden sonra, substratların ayrı ayrı ortama eklenerek yeni maddelere dönüştürülmesi hedeflenmiştir. Üretilen yeni maddeler besiyerinden uygun koşullarda ekstre edilerek ayrıştırılacak, İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile maddelerin varlığı tespit edilerek daha sonra küçük ölçekli Kolon Kromatografisi (KK) ile izolasyonu ve saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Ardından bileşiklerin yapısı Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GK/KS) ve Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektroskopisi (SK/KS) yöntemleri ile aydınlatılmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1 Alkaloitler

Alkaloitler bitkilerde doğal olarak oluşan ve yapılarında genellikle azot taşıyan bileşiklerdir (McNaught and Wilkinson, 1997, s. 156). Karbon, azot ve hidrojene ilaveten oksijen, kükürt ve daha nadir olarak klor, brom ve fosfor içerebilirler. Bazik özelliktedirler. Tatları genellikle acıdır ve kristal yapıda bileşiklerdir (Evans, 2008, s. 333).

Alkaloitler funguslar, bakteriler, bitkiler veya hayvanlar tarafından üretilebilirler. Buldukları yerden asit baz ekstraksiyonu ile tüketilebilirler. Geniş bir etki spektrumları vardır. Antimalaryal (kinin), astım (efedrin), vazodilatör (vinkamin), antiaritmik (kinidin), analjezik (morfin), antihiperглиsemik (piperin) örnek olarak verilebilir. Geleneksel ve modern tıpta da yaygın olarak faydalanılmaktadır. İlaç keşfi için iyi birer başlangıç maddesidirler. Alkaloitler toksik özellikte de olabilirler (Örn; atropin, tükürarin).

Alkaloitler kimyasal olarak karbon iskeletlerine (örn; izokinolin, indol, piridin) göre sınıflandırılabilirler. Ancak alkaloitler için beş majör gruptan bahsedilebilir:

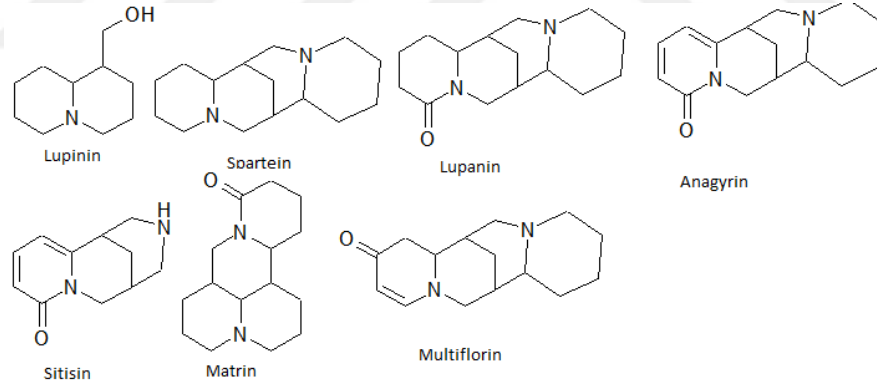
Gerçek alkaloidler, protoalkaloidler, psödoalkaloidler, poliamin alkaloidleri, peptit ve siklopeptit alkaloidler.

Yapılarında oksijen taşıyan alkaloidler genellikle renksiz ve kristal yapıdadırlar. Nikotin ve koniin gibi yapısında oksijen taşımayan alkaloidler ise uçucu, renksiz ve sıvı haldedirler. Berberin (sarı) ve sanguinarin (kırmızı) gibi bazı alkaloidler de renklidirler. Alkaloidler önemli farmakolojik etkilere sahiptirler.

Tez çalışmamızda substrat molekülü olarak kullanılan alkaloidler olan matrin (1) ve oksimatrin (2), kinolizidin grubu alkaloidlerden olduğundan, kinolizidin grubu alkaloidler hakkında öz bilgilere değinilmiştir.

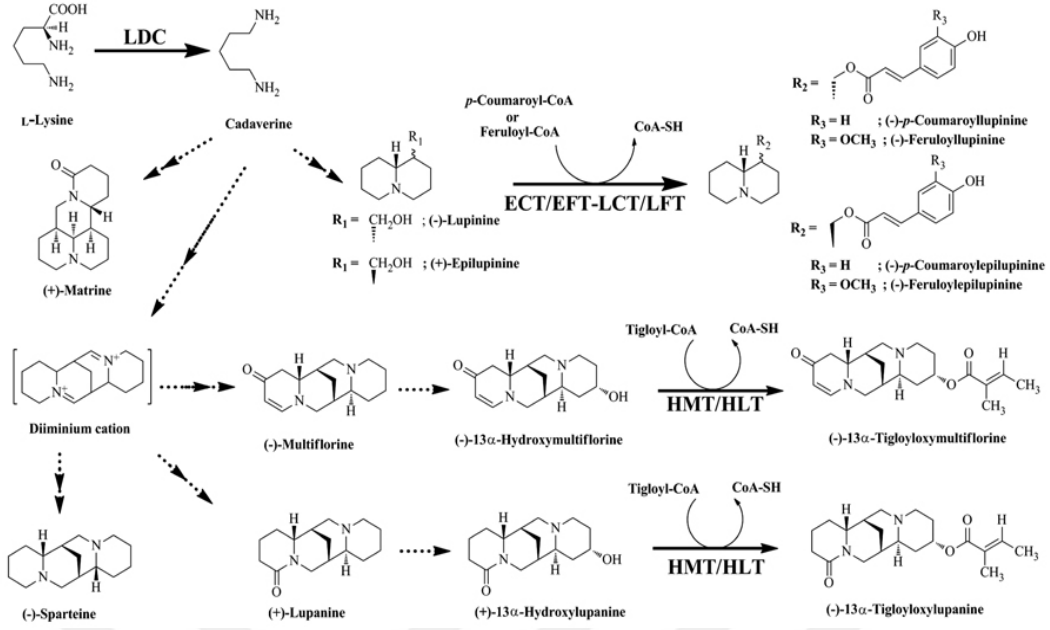
2.2. Kinolizidin Grubu Alkaloidler, Biyolojik Aktiviteleri ve Özellikleri

Kinolizidin grubu alkaloidler bilinen yaklaşık 7000 alkaloidin % 2'sini oluşturur. Kendi içerisinde de 6 farklı gruba ayrılabilir: Lupinin ve esterleri, spartein gibi tetrasiklik kinolizidin alkaloidleri, lupanin, anagyryn, tetrahidrorombifolin, stisin, matrin (1), multiflorin (Kinghorn and Balandrin, 1984, s. 105).



Şekil 2.1. Kinolizidin alkaloidlerinin yapısal grupları

Kinolizidin alkaloidleri Fabaceae ve Genisteae familyalarının karakteristik sekonder metabolitidir (Schütte, 1969, s. 324; Nowacki and Waller, 1977, s. 36). Kinolizidin grubu alkaloidler diğer alkaloidlerin çoğu gibi İTK plağı üzerinde Dragendorff Reaktifi ile teşhis edilebilirler. YBSK, kinolizidin alkaloidlerini preparatif olarak izole edebilmek için uygun bir metottur (Cho and Martin, 1971, s. 46; Wink, 1984, s. 56).



Şekil 2.2. Kinolizidin alkaloitlerinin biyosentezi

Bu alkaloitler çoğu organizma için toksik özelliktedir. Spartein ve lupanin üzerinde yapılan çalışmalar bu bileşiklerin antiaritmik ve oksitosik olduğunu göstermiştir. Lupinin hipoglisemik, matrin (**1**) sitotoksik ve antipiretik, stisin halusinojenik, anagirin ise teratojenik etki göstermektedir. 150'den fazla kinolizidin alkaloiti henüz canlı sistemlerde denenmemiş ve etkisi araştırılmamıştır (Cho vd., 1986, s. 343; Schultes and Hofmann, 1980, s. 90; Wink, 1984, s. 57). Doğu Asya'da matrin (**1**) ve lupinin geleneksel tıpta kullanılmaktadır (Cho vd., 1986, s. 343).

Kinolizidin alkaloitleri çeşitli bakteri ve mantarlar üzerinde ciddi aktiviteleri olan bileşiklerdir (Wippich and Wink, 1984, s. 57). Etki değerleri 0,5-5 mM arasındadır ve bu değer toksik bir bileşik için oldukça yüksektir (Wink, 1984, s. 57).

Tablo 2.1. *Kinolizidin alkaloitlerinin sahip olduğu bazı biyolojik aktiviteler*

BİYOLOJİK AKTİVİTE	
Antimikrobiyal	Lupinler
Antitümöral	Matrin (1) ve oksimatrin (2)
Antiviral	Matrin (1) ve oksimatrin (2)
Fungisidal	Lupinler
Antioksidan	Sparteın

2.3. Matrin (1) ve Oksimatrin (2) in Özellikleri ve Biyolojik Aktiviteleri

Sophora türleri dünyada en çok Çin, Japonya ve Avrupa'nın belirli kesimlerinde yetişen bitkilerdir ve Antik Çin tıbbında yaygın olarak kullanılmaktadır (Dai vd., 2009, s. 92). Matrin (1) ve oksimatrin (2), en çok *Sophora* türlerinin köklerinden elde edilmektedir (Zhou vd., 2014, s. 933).

Matrin (1) ve oksimatrin (2) in sentez yoluyla çeşitli türevleri elde edilmiş ve aktivite iyileştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu konuda, mikrobiyal transformasyonla elde edilen metabolitlerin de söz konusu aktivitelerde artan bir etkiye sahip olacağı düşünülmektedir.

2.3.1. Matrin (1)

Matrin (1), *Sophora* türlerinin önemli bir biyoaktif bileşenidir. Özellikle servikal kanser konusunda matrin (1) oldukça ön plana çıkmış ve bu konuda çalışmalar yapılmıştır (Zhang, 2015, s. 1056). Yapılan başka bir çalışmada da matrin (1) in MTT Assay ile MCF-7 meme kanseri hücrelerinin üremesini engellediği anlaşılmıştır. Matrin (1) in organizmaya verilmesinden 48 saat sonra, MCF-7 hücre döngüsünün değiştiği saptanmıştır. Matrin (1) in bu hücre döngüsünün özellikle S-G0-G1 fazlarında etkili olduğu belirtilmiştir (Shi vd., 2015, s. 461).

Matrin (1) bir flavonoid olan huangqin ile kombine edildiğinde egzamada oldukça iyi bir etki göstermiştir. Yine Çin'de yapılan bir araştırmada matrin (1) in farelerde Hepatit B'yi önlediği tespit edilmiştir. LPS-Uyarılmış tümör nekroz faktörü (TNF) ile interlökin-6 (IL-6) salınımını inhibe ettiği ve Hepatik fibrozisi azalttığı ortaya konmuştur (Long vd., 2004, s. 52).

Aynı zamanda toksik bir bileşiktir. Ratların HepG2 hücreleri üzerinde toksisitesi vardır. Antitümör aktivitesinin yanı sıra, kemoterapi ve radyoterapinin zararlı

etkilerinden korunmak için diğerk ilaçlarla kombine halde kullanılmaktadır. İnsanda toksik etkisi daha çok karaciğeri ve sinir sistemi üzerindedir (Li, 2015, s. 98).

2.3.2. Oksimatin (2)

Kanser çalışmalarında oldukça sık çalışılmış bileşiklerden olan oksimatin (2) in kardiyak aritmilerde ve bazı kalp rahatsızlıklarında incelendiğı bilinmektedir (Zhang vd., 2014, s. 1056). Zhou ve arkadaşlarının 2015'te yapmış oldukları bir çalışmada sayfa 1056'da belirtildiğı üzere oksimatin (2) in serebral iskemiye ilişkin aktivitesi saptanmıştır.

Çin'de bir geleneksel tıbbi ilaç olarak oldukça yaygın olarak tanınan *Sophora flavescens* A., sıcak suda ekstresi hazırlanmak suretiyle antiviral etkisinden ötürü kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda da bitki içerisinde yer alan oksimatin (2) in, güçlü antiviral etkisinin olduğı ortaya konulmuştur (Krishna vd., 2012, s. 1146).

Viral Hepatit C'de oksimatin (2) ile olumlu sonuçlar alınmıştır. Oksimatin (2), daha toksik bir metaboliti olan matrin (1) e kolaylıkla dönüşebilmektedir. Bu dönüşüm karaciğeri mikrozomal enzimleri (HLMs), Bağırsak enzimleri (HIMs) ve CYP4 ile kolaylıkla gerçekleşmektedir (Long vd., 2004, s. 70).

2.4. Matrin (1) ve Oksimatin (2) in Mikrobiyal Transformasyonu

Çalışmamızda kullandığımız kinolizidin alkaloidleri olan matrin (1) ve oksimatin (2), doğada başlıca *Sophora* türlerinde bulunmaktadır. Oksimatin (2) organizmada kolaylıkla matrin (1) e dönüşebilmektedir (Kingham vd., 1984, s. 105). Matrin (1) ve oksimatin (2) ile ilgili diğerk özet bilgiler Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Tablo 2. 2. Matrin (1) ve oksimatrin (2) in fizikokimyasal özellikleri

MATRİN	
IUPAC ismi (7a <i>S</i> ,13a <i>R</i> ,13b <i>R</i> ,13c <i>S</i>)- dodecahydro-1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> ,10 <i>H</i> - dipyrido[2,1- <i>f</i> :3',2'.1'- <i>ij</i>][1,6]naphtyridin-10-one	Moleküler Formül C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O Cas No 519-02-8 Moleküler ağırlık g/mol: 248,364
OKSİMATRİN	
IUPAC ismi (7a <i>S</i> ,13a <i>R</i> ,13b <i>R</i> ,13c <i>S</i>)- dodecahydro-1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> ,10 <i>H</i> - dipyrido[2,1- <i>f</i> :3',2'.1'- <i>ij</i>][1,6]naphtyridin-10-one 4- oxide	Moleküler Formül C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂ Cas No CAS No:16837-52-8 Moleküler ağırlık g/mol: 264.37

2.5. Matrin (1) ve Oksimatrin (2) in Biyotransformasyonu İlgili Yapılmış Çalışmalar

Biyotransformasyon, farmakolojik olarak *in vivo* şartlarda vücuda giren yabancı maddelerin karaciğerde bulunan enzimler tarafından zararsız hale getirilmesini sağlayan biyokimyasal reaksiyonları ifade ederken; mikrobiyal transformasyon, canlılığı ve gelişimi sağlanan mikroorganizmaların bulunduğu besi ortamlarına, substrat ilavesi ile gerçekleşen bir seri oksidasyon, redüksiyon, dekarboksilasyon veya hidroliz vb. reaksiyonlarını kapsayarak yeni metabolitlerin sentezlenmesine denir (Leuenberger, 1990, s. 760).

Biyotransformasyon reaksiyonlarında mikroorganizmalar dışında bütün hücre sistemleri (canlı bitki, bitki doku ve hücre kültürleri, canlı hayvan, hayvan doku ve hücre kültürleri ve insan) ile hücre dışı preparatlar (saflaştırılmamış ve saflaştırılmış enzimler) da katalizör olarak kullanılabilir (Demirci, 2000, s. 12; Houjin vd. 2006, s. 947; Grogan, 2009, s. 1; Schewe vd., 2011, s. 1886). Ancak mikrobiyal hücrelerin katalizlediği biyotransformasyon reaksiyonlarının kısa sürede gerçekleşmesi, mikrobiyal hücrelerin metabolize edebildikleri substrat çeşitliliğinin fazlalığı ile

mikrobiyal biyotransformasyon diğer bütün hücre sistemleriyle gerçekleştirilen biyotransformasyonlara göre üstünlüklere sahiptir (Demirci, 2000, s. 15). Mikrobiyal transformasyonlarda en sık gerçekleşen reaksiyonlar, oksidoredüktaz ve hidrolaz enzimlerinin katalizlemiş olduğu yükseltgenme ile C-N, glikozit, peptit, ester ve amit gruplarının hidroliz reaksiyonlarıdır (Loughlin, 2000, s. 50).

Bu reaksiyonlarda rol oynayan enzimler: Oksidoredüktazlar (EC-1), transferazlar (EC-2), hidrolazlar (EC-3), liyazlar (EC-4), izomerazlar (EC-5), ligazlardır (EC-6) (Demirci, 2000, s. 20). Özellikle oksidoredüktazlardan sitokrom P450 (CYP450) enzim grubu yükseltgenme reaksiyonlarını ve yukarıdaki reaksiyonların çoğunu katalizleyen önemli bir monooksijenazdır (Schewe vd., 2011, s. 1886).

Yapılan kaynak araştırmasında matrin (1) ile yapılmış fungus veya bakterilerin bütün hücre sistemleri olarak kullanılmasıyla gerçekleşen biyotransformasyon çalışmasına rastlanmazken, oksimatrin (2) in bir takım mikroorganizmalarla biyotransformasyonunu konu alan bir yüksek lisans tezi mevcuttur (Iverson, 2010, s. 76). Bu tezde *Penicillium chrysogenum* (ATCC 9480), *Cunninghamella blakesleena* (ATCC 9245 ve 8688A), *Cunninghamella bainieri* (ATCC 9244), *Curvularia lunata* (ATCC 12017) ve *Fusarium sp.* ile oksimatrin (2) in matrin (1) e dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Aynı mikroorganizmalarla matrin (1) in de biyotransformasyonu denenmiş ancak bir sonuç alınamamıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

- Anisaldehit (Fluka)
- Aseton (Merck)
- Dimetil sülfoksit (Riedel de Haen)
- Dimetilamin (Merck)
- Etanol (Merck)
- Etil asetat (Carlo Erba)
- Glasiyel asetik Asit (Carlo Erba)
- Glikoz (Fluka)
- Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
- Ketokonazol (Merck)
- Kloramfenikol (Sigma)
- Kloroform (Merck)
- Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- Matrin **(1)** (Sigma)
- Maya ekstresi (Fluka)
- Metanol (Merck)
- N-Butanol (Merck)
- *n*-Hekzan (Merck)
- Oksimatrın **(2)** (Sigma)
- Pepton (Fluka)
- Potasyum klorür (KCl) (Merck)
- Potato Dekstroz Agar (Merck)
- Sabouroud Glukoz Agar (Fluka)
- Sodyum klorür (NaCl) (Fluka)
- Susuz sodyum sülfat (Fluka)
- Sülfürik asit (Riedel de Haen)

3.1.2.Kullanılan sarf malzemeleri

Hazır İTK plakları (İTK-Silicajel 60 GF₂₅₄, por 15 µm Merck), cam pastör pipetleri, tek kullanımlık plastik kapaklı Petri (90 mm x 25, ISOLAB), cam kapaklı Petri (150 mm), tek kullanımlık plastik pipetler (1000, 100 µL), 96 kuyucuklu mikroplate, vakumlu filtrasyon sistemi, (Sartorius), Drummond kılcal borular.

3.1.3.Kullanılan aletler ve cihazlar

- Bakteriyolojik Etüv (MMM Incucell)
- Biotek Precision XS robotik pipetleme sistemi
- Çalkalamalı inkübatör (New Brunswick Scientific)
- Distile Su Cihazı (Milipor, Milli-Q Synthesis A10)
- Gaz kromatografisi/Kütle Spektrometrisi Sistemi (GK-KS) (Shimadzu GC 2010)
- Microplate Reader (BioTek-Synergy H1)
- Mikroplate spektrofotometre (BioTek, Powerwave XS)
- Otoklav (Hirayama, HV-50)
- Otomatik multikanal pipetör (Brand)
- pH metre (WTW Inolab)
- Robotik Pipetleme Sistemi (BioTek-Precision Power)
- Rotavapor, (Heidolph) ve (Buchi)
- Santrifüj (Sigma)
- Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrofotometresi (SK-KS) (Waters)
- Steril Kabin (Heal force HF SAFE 900)
- Ultra derin dondurucu (-85 °C) (New Brunswick Scientific)
- Ultrasonik banyo (Bandalin-Sonorex)
- Vakumlu sentrifügal yoğunlaştırıcı (Labconco)
- Vorteks karıştırıcı (İka Genius 3)

3.1.4.Biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü ve Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi kültür koleksiyonundan temin edilmiştir (Tablo 3.1.).

Tablo 3.3. Biotransformasyonda kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizma /Kaynak	
<i>Alternaria alternata</i> (Ege Üniv. izolat)	<i>Hansenula anomala</i> ATCC 20170
<i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL 317	<i>Mucor ramannianus</i> ATCC 1839
<i>Aspergillus nidulans</i> (ESOGU izolat)	<i>Penicillium adametzii</i> NRRL 737
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 326	<i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 317
<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999	<i>Penicillium primulinum</i> (AÜ Ecz Fak.izolat)
<i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-14580	<i>Penicillium valentinum</i> (AÜ Ecz Fak.izolat)
<i>Botrytis cinerea</i> AHU 9424	<i>Phanerachaete chrysosporium</i> (AÜ Ecz Fak.izolat)
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> (AÜ Ecz Fak.izolat)
<i>Corynespora cassiicola</i> DSM 62474	<i>Saccharomyces cereviciae</i> ATCC 9763
<i>Enterococcus faecalis</i> (AÜ Fen Fak.. izolat)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
<i>Escherichia coli</i> NRRL B-3008	<i>Streptococcus epidermidis</i> ATCC 14990
<i>Fusarium culmorum</i> (AÜ. Fen Fak. İzolat)	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 23137
<i>Fusarium moniliforme</i> NRRL 2374	<i>Sporobolomyces pararoseus</i> ATCC 11385
<i>Fusarium solani</i> ATCC 1284	<i>Trametes versicolor</i> ATCC 200801
<i>Fusarium heterosporium</i> (ESOGU izolat)	<i>Trichothecium roseum</i> (AÜ Ecz Fak.izolat)

3.1.5. Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Kullanılan mikroorganizmalar Tablo 3.2.'de görülmektedir.

Tablo 3.4. Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizma/Kaynak
<i>Escherichia coli</i> /NRRL B-3008
<i>Staphylococcus aureus</i> /ATCC 6538
<i>Staphylococcus epidermidis</i> /ATCC 14990
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> /ATCC 10145
<i>Candida albicans</i> /ATCC 90028
<i>Helicobacter pylori</i> /ATCC 43504
<i>Mycobacterium smegmatis</i> /ATCC 14468
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> /ATCC 6841
<i>M. avium</i> (klinik izolat)

3.1.6. Test maddelerinin analiz koşulları

Matrin (1), oksimatin (2) ve biyotransformasyonu sonucu elde edilen metabolitler için GK/KS ve SK/KS sistemi kullanılmıştır.

GK/KS Sistem: Shimadzu GC 2010

Dedektör: Kütle Spektrometresi

Kolon: TRB5MS polar kolon (25 m x 0.25 mm çap, 0.25 μ m film kalınlığı)

Taşıyıcı gaz: Helyum (1 mL/dk akış hızı) kullanılmıştır.

Enjeksiyon portu sıcaklığı: 300 °C

Dedeksiyon aralığı: 70 eV elektron enerjisiyle, m/z 35-450 kütle aralığındaki maddelerin analizleri (**Split:** 50/1) gerçekleştirilmiştir.

Sıcaklık Programı: 60 °C'de 10 dk, 4 °C/dk artışla 300 °C'ye çıkan, 300 °C'de 5 dk bekleyen toplam 65 dakikalık sıcaklık programı uygulanmıştır.

SK/KS Sistem: Waters ACQUITY SQD LC/MS SYSTEM

Dedektör: Kütle Spektrometresi Waters 3100

Kolon: TRB5MS polar kolon (50 m x 0.35 mm)

Mobil faz: Su:ACN

Enjeksiyon portu sıcaklığı: 30 °C

3.2. Yöntem

3.2.1. Biyotransformasyon çalışmaları

Biyotransformasyon çalışmaları ön tarama deneyleri ve preparatif biyotransformasyon olmak üzere iki aşamada gerçekleşmiştir. İlk aşamada 30 mikroorganizma içinden substrat molekülü matrin (1) ve oksimatin (2) ile etkin ve verimli dönüşümler gerçekleştiren mikroorganizmalar ön tarama deneyleriyle belirlenmiş ve ikinci aşamada büyük ölçekli biyotransformasyonla elde edilen metabolitler biyolojik aktivite testleri için kolon kromatografisiyle saflaştırılmıştır.

3.2.1.1. Mikroorganizmaların temini ve saklanması

Mikroorganizmalar, Farmakognozi Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilmiş (Tablo 3.1.) ve Sabouraud Glikoz Agar (SGA), Patates Dekstroz Agar (PDA)

katı besiyerlerinde; eğik tüpte ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Bununla birlikte stok mikroorganizmalar kapaklı eppendorf tüplerde -85 °C'de saklanmıştır. İhtiyaç duyulduğunda mikroorganizma saklandığı yerden alınarak oda sıcaklığında steril şartlarda uygun katı besiyerlerine ekilmiştir. Böylelikle mikroorganizmalar canlandırılmış ve saflığının kontrolü yapılmıştır. Bu amaçla çalışmamızda funguslar için Sabouraud Glikoz Agar (SGA), bakteriler için Müller Hinton Agar (MHA) katı besiyerleri kullanılmıştır. Daha sonra gelişimi yeterince sağlanmış mikroorganizmalar biyotransformasyonda kullanılmak üzere zenginleştirilmiş sıvı besiyeri α -medyum'a inoküle edilerek ön-inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.1.2. Besiyerlerinin hazırlanması

Alfa medyum besiyeri: 20 g glikoz, 5 g pepton, 5 g maya ekstresi, 5 g NaCl ve 5 g Na₂HPO₄ distile suyla 1000 mL'ye tamamlanmıştır. 250 mL'lik erlenlerin her birine 100 mL besiyeri ilave edilmiştir. Erlen şişeleri pamukla kapatıldıktan sonra pamuğun üzeri alüminyum folyo ile kaplanarak 121 °C'de 1.1 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak besiyeri steril hale getirilmiştir.

Hazır besi ortamları: Çalışmamızda kullanılan, Mueller-Hinton Broth (Fluka), Mueller Hinton Agar (Fluka), Sabouraud Glukoz Agar (Fluka), Patates Dekstroz Agar (Merck), Malt Ekstrakt Agar (Fluka), Malt Ekstrakt Broth (Merck), Nutrient Agar (Fluka) gibi hazır olarak temin edilen besi ortamları orjinal ambalajındaki tarife uygun olarak hazırlanmıştır. Katı besiyerleri 121 °C'de ve 1.1 atmosfer basınç altında, 20 dakika steril hale getirilerek, laminar akışlı kabin altında steril petrilere yaklaşık 15 mL dökülmüş ve soğuması sağlandıktan sonra kullanılabilecek kadar +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Sıvı besiyerleri ise mikroorganizmalar ile aşılardan önce, erlenlerde pamukla kapatılmış şekilde sterilize edilmiştir. Besiyerleri en fazla 2 hafta süreyle saklanmış, kullanılacağı güne kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.3. Ön tarama deneyleri

Ön tarama deneyleri, Tablo 3.1.'de listelenmiş olan her bir mikroorganizma için tek tek gerçekleştirilmiştir.

Kontrol Grupları: Tüm biyotransformasyon çalışmalarında metabolitlerin mikrobiyal transformasyon ürünleri olup olmadığını anlamak amacıyla, aynı koşullarda

hazırlanmış ve besi yeri; besi yeri + mikroorganizma bulunduran iki erlen kontrol amaçlı kullanılmıştır.

Mikroorganizmaların aşılınması ve adaptasyonu: Bir öze dolusu mikroorganizma aseptik koşullarda uygun katı besiyeri içeren petrilere inoküle edilmiş, fungus ve mayalar için 26-28 °C, 24-72 saat; bakteriler için 37 °C, 24 saat olan inkübasyon şartlarında petrilere gelişime bırakılmıştır. Bu süre sonunda gelişen mikroorganizmalar, 250 mL erlenler içinde bulunan 100 mL steril zenginleştirilmiş sıvı besiyerine (α -medyum) aktarılmıştır. Aşılana erlenler uygun sıcaklıklarda 160 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 48 saat boyunca ön inkübasyona bırakılmıştır. Erlenlerden biri mikroorganizma kontrolü olarak kullanılırken, diğerine 3-5 mg substrat steril şartlarda su içerisinde çözündürüldükten sonra ilave edilmiştir. İki erlen kontrol amaçlı kullanılmak üzere diğer erlenlerle birlikte çalkalamalı inkübatörde 15 günlük inkübasyona bırakılmıştır.

Metabolitlerin Ekstraksiyonu: Biyotransformasyonun 1., 3., 5., 7., 9., 11. ve 13. günlerinde metabolit oluşumunu kontrol etmek amacıyla ekstraksiyon yapılmıştır. Bu amaçla steril şartlarda steril uçlu pipetlerle erlenlerden 3 mL besiyeri içeriği alınarak deney tüplerine aktarılmıştır. Deney tüplerine 3 mL $CHCl_3$ ilave edilmiş ve deney tüpleri 1 dakika kadar vortekslenmiştir. Ardından bir müddet bekletilmiş ve berrak faz pipetle diğer bir deney tüpüne aktarılmıştır. Bu işlem her erlen için 3 defa tekrarlanarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. $CHCl_3$ vakumlu hızlı yoğunlaştırıcı kullanılarak ekstreden uzaklaştırılmıştır. Ekstrede metabolit oluşumu İTK sistemiyle kontrol edilmiştir. Bu amaçla 0.25 mm kalınlığında hazır silika jel tabakalarına numuneler spotlandıktan sonra, tabaka Dietileter:Metanol:Amonyak (40:4:1) ve Etilasetat:Metanol:Dietilamin (40:60:0.5) çözücü sistemi kullanılarak geliştirilmiştir. Silikajel tabaka kurduktan sonra UV ışık altında 254/364 nm dalga boyunda oluşan metabolitler işaretlenmiş, UV altında ışınması olmayan metabolitleri tespit etmek amacıyla ise Dragendorff reaktifi ile muamale edilmiştir. Hem UV lambası altında işaretlenen, hem Dragendorff reaktifiyle renklendirilen spotlara bakılarak değerlendirme yapılmıştır. Buna göre, ekstrenin ve kontrol gruplarının oluşturduğu spotlar karşılaştırılmış, kontrol gruplarından farklı olan spotlar metabolit olarak düşünülmüştür. Metabolit varlığı belirlendiğinde GK/KS ve SK/KS sistemi ile doğrulama ve yapı tayini analizleri yapılmıştır.

Sonlandırma ve Ekstraksiyon: Transformasyonun 15. gününde süreç sonlandırılmıştır. Bu amaçla, 50 mL CHCl_3 mikrobiyal transformasyonun gerçekleştiği erlene ve kontrol grubu erlenlerine ilave edilmiş ve 1 dakika kadar karıştırılmıştır. Faz ayrımının tamamen görüldüğü anda altta kalan faz, içine bir miktar susuz sodyum sülfat konulmuş Whatman filtre kağıdından geçirilerek rotavapor balonuna aktarılmıştır. Bu işlem en az 3 defa tekrarlanmış ve süzülen ekstre balonda biriktirilmiştir. Daha sonra rotavapor 45 °C ve 100 rpm'e ayarlanarak, CHCl_3 alçak basınç altında yoğunlaştırılarak uzaklaştırılmıştır. Çözücüsü uzaklaştırılan ekstre pastör pipeti, cam yünü ve silika yardımıyla oluşturulan küçük kolondan geçirilerek mikroorganizma artığı olan safsızlıklardan arındırılmıştır. Ardından metabolit varlığını belirlemek ve doğrulamak amacıyla İTK ve SK/KS sistemleriyle analiz yapılmıştır.

3.2.1.4. Preparatif ölçekli biyotransformasyon

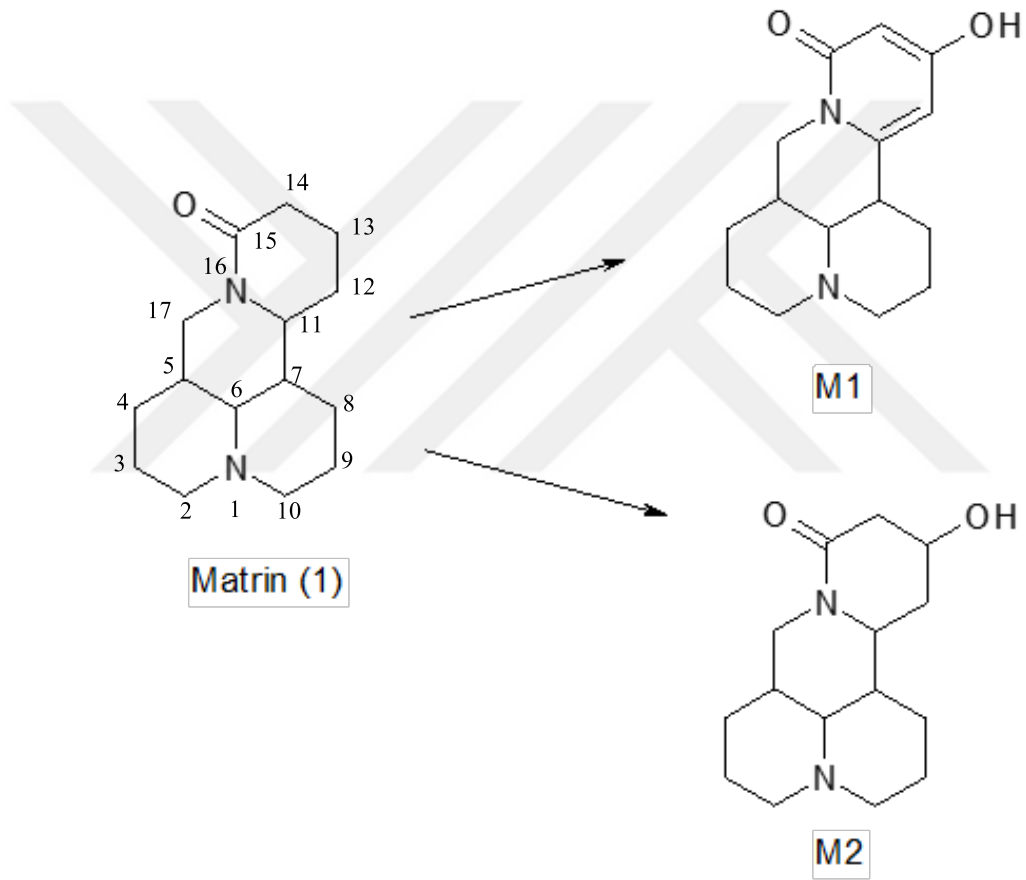
Ön tarama deneylerinde İTK ve SK/KS sistemleri ile metabolit oluştuğu belirlenen kültür ortamları, oluşturdukları metabolitlerin biyolojik etkilerinin araştırılması amacıyla preparatif ölçekli biyotransformasyon için büyük hacimlerde hazırlanmıştır. Bunun için 2 litrelik erlenlerde 1 L besiyeri hazırlanmış, madde ilavesinden 48-72 saat önce *Mucor ramannianus* ve *Enterococcus faecalis* ile aşılansak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, aseptik şartlar altında 15 mg başlangıç maddesi, 160 rpm ve 28 °C'de çalkalayıcı inkübatöre bırakılmıştır.

Sonlandırma, Ekstraksiyon ve Saflaştırma: Ön tarama deneylerine göre, metabolit oluşumunun en yüksek seviyede olduğu gün transformasyon işlemine son verilerek, besiyeri CHCl_3 ile ekstre edilmiştir. Öncelikle vakumlu Buchner hunisi kullanılarak besiyeri misellerden kurtarılmıştır. Süzülen besiyeri hacmi kadar CHCl_3 ile ayırma hunisinde en az 3 defa ekstre edilmiştir. Ayrılan fazlar birleştirilerek öncelikle susuz Na_2SO_4 'tan geçirilmiş ardından alçak basınç altında 45 °C'de yoğunlaştırılmıştır. Silikajel kolondan süzöldükten sonra metabolit varlığı SK/KS kullanılarak doğrulanmıştır. Elde edilen ekstre küçük pastör pipetlerinde etanol yardımıyla silikajel kolon dolgu maddesinden geçirilerek saflaştırılmış, hedef metabolitin ayrımı ve izolasyonu yapılmıştır.

4. BULGULAR

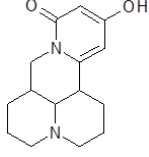
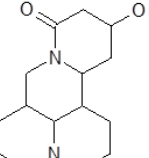
4.1. Ön Tarama Çalışmaları Sonucunda Oluşan Metabolitler

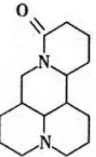
Matrin (1) ve oksimatin (2) in seçili mikroorganizmalarla biyotransformasyonu sonucu oluşan ve SK/KS’de yapısı tanımlanan metabolitler Çizelge 4.1.’de görülmektedir. Ön tarama deneyleri boyunca metabolit oluşumunu izlemek amacıyla gerçekleştirilen İTK deneylerine ait bazı plaklar Ekler başlığı Ön Tarama Deneyleri bölümünde verilmiştir.



Şekil 4.1. Matrinden biyotransformasyon sonucu metabolitler

Tablo 4.2. Ön tarama deneyleri sonucu oluşan metabolitler

Metabolit (Matrin (1))	Kullanılan Mikroorganizma
 M1	<i>Mucor ramannianus</i>
 M2	<i>Enterococcus faecalis</i>

Metabolit (Oksimatrin (2))	Kullanılan Mikroorganizma
	<i>Alternaria alternata</i> <i>Pycnosporus cinnabarinus</i> <i>Mucor ramannianus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Fusarium solani</i>

4.1.1. Metabolitlerin saflaştırılması ve yapı tayinleri

Matrin (1) ve oksimatrinin (2) mikrobiyal transformasyonu sonucu oluşan metabolitlerin izlenmesi İTK ve KS sistemi ile gerçekleştirilmiş, bunlardan büyük ölçekli biyotransformasyon ürünü olan M1 ve M2 metabolitleri izole edilebilmiştir.

Oluşan metabolitlerin miktarının az olması sebebiyle, madde kaybı olmaması açısından ekstre besiyerinden gelen kirliliklerden arındırılması için pastör pipetinde silikajelden geçirilmiş, azot gazı altında çözücüsünden kurtarılmış, elde edilen kısım KS ile yapı aydınlatma ve aktivite çalışmalarında kullanılmıştır. KS’de matrin metaboliti için en iyi piki ve sonucu aldığımız metot kullanılmıştır.

Maddelerin azlığı ve tam olarak saflaştırılamaması nedeniyle NMR spektrumu alınamayan metabolitlerin yapı analizleri KS sonuçlarının yorumlanması ile

gerçekleştirilmiştir. Matrinin kimyasal olarak inert bir yapıda olduğu ve 13 numaralı konumdan hidroksilasyonu haricinde kimyasal bir reaksiyona giremeyeceği düşünüldüğü için KS analizi sonucunda kütle numarasından yola çıkılarak yapı yorumlaması yapılmıştır.

M1 metabolitinin moleküler iyon piki m/z 261 olarak belirlenmiştir. Matrinin molekül ağırlığı ile belirlenen fark 13'tür. Matrinin molekülünün kimyasal olarak inert olduğu düşünülürse ancak 13 nolu karbon atomuna bir hidroksil eklenebileceği ve 11-12 ile 13-14 pozisyonlarında doymamış yapıların oluşabileceği yorumu yapılarak M1 metaboliti tanımlanmıştır.

M2 metabolitinin moleküler iyon piki m/z 264 olarak belirlenmiştir. Matrinin molekül ağırlığı ile belirlenen fark 16'dır. M1 metabolitinin tanımlanmasında kullanılan kimyasal özelliklerden dolayı bu farkın 13 pozisyonundaki bir OH katılımindan olduğu yorumu yapılmıştır.

Oksimatrin metaboliti olarak da matrin belirlenmiştir.

4.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

4.2.1. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Biyotransformasyonda kullanılan substrat ve elde edilen metabolitlerinin biyolojik aktiviteleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu amaçla mikrodilüsyon yönteminde daha önce Tablo 3.4.'te belirtilen mikroorganizmalar kullanılmıştır.

4.2.1.1. Mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Mikroorganizma kültürlerinin geliştirilmesi: -85 °C'de ve -20 °C'de saklanan bakteriyel kültürler canlandırılmak üzere Mueller Hinton Agar (MHA) ve Mueller Hinton Broth (MHB) 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. *Candida albicans* suşunun gelişmesi ise 37 °C'de 24 saat Potatoes Dextrose Agar (PDA) ve RPMI ile sağlanmıştır. İnkübasyondan sonra turbidometre ile McFarland No: 0.5 tüpüne göre mikroorganizmaların kültür yoğunlukları ayarlanmıştır (CLSI, 2002, s. 45; CLSI, 2006, s. 67).

Helicobacter pylori suşu canlandırılmak üzere % 5 (h/h) at kanı içeren Colombia agar ve % 10 (h/h) fetal sığır serumu içeren Brusella broth kullanılarak anaerobik inkübatörde (% 5 CO₂), yaklaşık 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda

besiyeri üzerinde gelişen tekli kolonilerden alınarak türbidometre ile McFarland No:0,5 ayarı yapılmıştır (CLSI, 2007, s. 78).

Test edilecek numuneler Dimetil-Sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek distile su ile seyreltilmiştir.

Mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi: Çalışmada 96 adet flat bottom kuyucuklara sahip mikrotitrasyon Petrileri kullanılmıştır. Seyreltilmiş numunelerden 100'er μL mikrotitrasyon Petrilerine aktarılmıştır ve seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Bakteriler için pozitif kontrol olarak amoksisilin, klaritromisin ve tetrasiklin; *Candida* için nistatin ve ketokenazol pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir.

Antibakteriyel aktivite çalışması: Her kuyucuğa yoğunluk ayarı yapılmış ve 1:100 seyreltilmiş 100 μL mikroorganizma eklendikten sonra test numuneleri ve mikroorganizmalar 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (CLSI, 2007, s. 78; Demirci vd., 2009, s. 24).

Antihelikobakter aktivite çalışması: Yoğunluk ayarı yapılmış ve 1:10 seyreltilmiş *Helicobacter* suşundan 100'er μL mikrotitrasyon Petrisinin kuyucuklarına eklenmiştir (CLSI, 2007, s. 78; EUCAST, 2011, s. 97; Whitmire ve Merrell, 2012, s. 35).

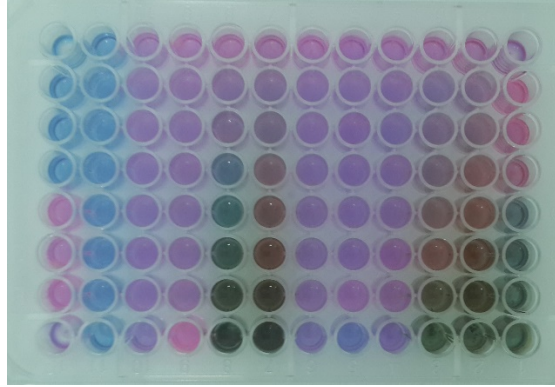
Antikandidal aktivite çalışması: Yoğunluk ayarı yapılmış ve 1:1000 seyreltilmiş *Candida* suşu 100'er μL mikrotitrasyon Petrisinin kuyucuklarına eklenmiştir (CLSI, 2002, s. 56)

İnkübasyon süresi sonunda renklenme için kuyucuklara 20'şer μL % 0.01 (a/h)'lik rezasurin çözeltisi eklenmiştir ve 37 °C'de 3 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda renklenme olmayan kuyucuklar üremenin olmadığını göstermiştir. Sonuçlar minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) olarak verilmiştir.

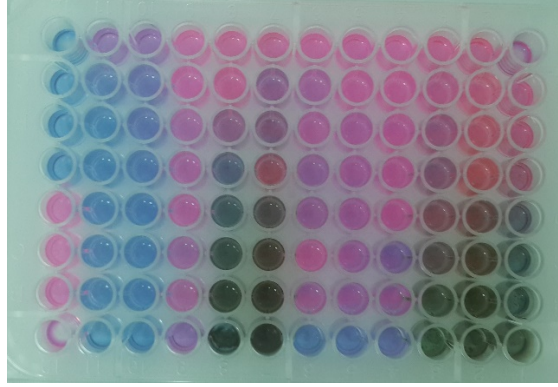
Numunelerin ve standart antimikrobiyallerin antimikrobiyal aktivite sonuçları Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Numunelerin (mg/mL) ve antimikrobisillerin ($\mu\text{g/mL}$) mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen antimikrobiyal aktivite sonuçları (Saf maddelerin MİK aralığı: 1-0,08 mg/mL Ekstrelerin MİK aralığı: 10-0,8 mg/mL Antimikrobisillerin MİK aralığı: 16-0,025 $\mu\text{g/mL}$)

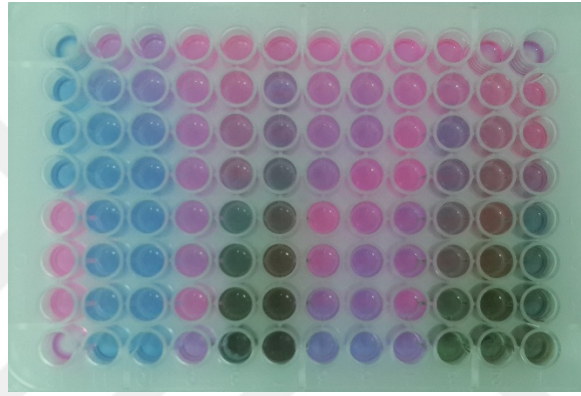
	<i>Escherihia coli</i> NRRL B-3008	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	<i>H. pylori</i> ATCC 43504	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028
Matrin	>1	>1	>1	>1	>1	>1
Oksimatrin	>1	>1	>1	>1	>1	>1
Amoksisilin	0,5	$\leq 0,125$	4	>16	$\leq 0,125$	
Klaritromisin	0,5	0,25	$\leq 0,125$	>16	0,025	
Tetrasiklin	16	0,25	>16	>16	0,025	
Ketokenazol						0,25
Nistatin						1,25



Şekil 4.2. *M. smegmatis* suşuna karşı numunelerin MİK değerleri



Şekil 4.3. *M. fortuitum* suşuna karşı numunelerin MİK değerleri



Şekil 4.4. *M. avium* suşuna karşı numunelerin MİK değerleri

4.2.2. Kolinesteraz inhibisyonunun belirlenmesi

Tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin AChE ve BChE enzim inhibisyon aktiviteleri Ellman metodu ile araştırılmıştır. Yöntemin her aşamasında Milipor, Milli-Q Synthesis A10 saflaştırma cihazından elde edilen distile su kullanılmıştır. Kullanılan bütün çözeltilerin taze hazırlanmasına ve hazırlandıktan sonra 1 hafta içerisinde tüketilmesine özen gösterilmiştir. Enzim inhibisyon çalışmasında hazırlanan çözeltilerin porsiyonlar halinde ayrılması, test bileşiklerinin 96 kuyucuklu plakalara uygulanması, enzim substrat çözeltilerinin ilave edilmesi işlemlerinde BioTek-Precision Power pipetleme sisteminden yararlanılmıştır. Enzim protokolünün oluşturulması, izlenmesi ve spektrofotometrik ölçümlerin alınması işlemleri, BioTek-Synergy H1 Microplate Reader cihazında yapılmıştır.

AChE ve BChE enzim solüsyonununun hazırlanması: Liyofilize haldeki AChE/BChE enzimini çözmek için % 1'lik jelatin çözeltisi hazırlanmıştır. AChE/BChE

enzimi jelatin çözeltisinde 500 U/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Enzim çözeltisinden 1 mL alınarak balon joje içerisinde hacim suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır. Böylelikle 5 U/mL'ye seyreltilmiş stok enzim solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti 0.7 mL'lik porsiyonlar halinde -20 °C'de saklanmıştır. Enzim çözeltileri, aktivite çalışmalarına başlamadan önce oda ısısına getirilmiş ve metod konsantrasyonu olan 2.5 U/mL'ye seyreltmek için suyla 1.4 mL'ye tamamlanarak kullanılmıştır.

Asetiltiyokolin iyodür (ATCI) çözeltisinin hazırlanması (0,075 M): ATCI (0.217 g) bir miktar suda çözülmüş ardından suyla 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti, kullanılıncaya kadar 0.4 mL'lik kısımlar halinde -20 °C'de saklanmıştır.

Bütiriltiyokolin iyodür (BTCI) çözeltisinin hazırlanması (0,075 M): BTCI (0.237 g) bir miktar suda çözülmüş ardından suyla 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti, kullanılıncaya kadar 0.4 mL'lik kısımlar halinde -20 °C'de saklanmıştır.

5-5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) solüsyonunun hazırlanması (0,01 M): DTNB (0.396 g) tartılarak bir miktar suda çözülmüştür. Bu çözeltiye sodyum bikarbonat (0.15 g) ilave edilmiş ve hacim suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti, kullanılıncaya kadar 3 mL'lik kısımlar halinde -20 °C'de saklanmıştır.

Fosfat tamponunun hazırlanması (pH=8.0): Potasyum dihidrojen fosfat (13.61 g), 1 L suda çözülmüştür. Hazırlanan çözeltinin pH'sı 0.1 N potasyum hidroksit çözeltisi ile pH metre kullanılarak kontrollü biçimde 8.0±0.1'e ayarlanmıştır. Ayarlı tampon çözelti 0.22 µm por çapı olan tek kullanımlık filtrelerden süzülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan çözelti, kullanılıncaya kadar 4 °C'de saklanmıştır.

İnhibitör bileşiklerin çözeltilerinin hazırlanması: Antikolinesteraz aktivite çalışmalarında sentezi gerçekleştirilen bileşikler % 2'lik dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde 10⁻³-10⁻⁹ M konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Bileşikler öncelikle 10⁻³ M konsantrasyonda hazırlanmış daha sonra 1/10'lük seri seyreltmeler ile diğer konsantrasyonlara geçilmiştir.

AChE ve BChE inhibisyon çalışması: Elde edilen bileşiklerin enzim inhibisyon aktiviteleri, öncelikle ön tarama niteliğinde olan 10⁻³ ve 10⁻⁴ M'lık iki konsantrasyonda gerçekleştirilmiştir. Aktivite değerleri % 0-100 aralığında inhibisyon şeklinde değerlendirilmiştir. Bileşiklerin 10⁻⁴ M konsantrasyonda % 50 ve daha fazla değerde

inhibisyon görüldüğü takdirde, 10^{-9} M konsantrasyona kadar alt konsantrasyonlarda inhibisyon oranları araştırılmıştır.

Biyoaktivite çalışmalarında kolorimetrik Ellman metodu modifiye edilerek enzim inhibisyonu incelemesi yapılmıştır. Test işlemine başlamadan önce bütün çözeltiler $20-25^{\circ}\text{C}$ 'ye getirilmiştir. Çalışmalarda 96 kuyucuklu plaklar kullanılmıştır. Her bir hücrede $140\ \mu\text{L}$ fosfat tamponu, $20\ \mu\text{L}$ enzim solüsyonu, $20\ \mu\text{L}$ inhibitör çözelti, $20\ \mu\text{L}$ DTNB çözeltisi, $10\ \mu\text{L}$ ATCI/BTCI çözeltisi olacak şekilde toplam $210\ \mu\text{L}$ hacme ulaşılmıştır. Çözeltiler, 96 kuyucuğa yetecek miktarlarda iki farklı test çözeltisi meydana getirecek şekilde karıştırılmıştır. Birinci test çözeltisi; 1 kuyucuk için $70\ \mu\text{L}$ fosfat tamponu, $20\ \mu\text{L}$ enzim çözeltisi ve $20\ \mu\text{L}$ DTNB çözeltisi, ikinci çözelti ise; 1 kuyucuk için $70\ \mu\text{L}$ fosfat tamponu ve $10\ \mu\text{L}$ ATCI/BTCI çözeltisi içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Öncelikle birinci test çözeltisi ve farklı konsantrasyonlardaki inhibitör bileşiği çözeltileri ($20\ \mu\text{L}$), 96 kuyucuklu plakalara Biotek Precision XS robotik sistemi kullanılarak eklenmiştir. İnhibitör bileşiklerinin her konsantrasyonu plaklara 4 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Plakalar, BioTek-Synergy H1 mikropilaya okuyucusuna konarak önce 5 dakika süreyle karıştırılmış daha sonra 25°C 'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde mikropilaya okuyucusu dispenser haznesinde bulunan ikinci test çözeltisinin her bir kuyucuğa $80\ \mu\text{L}$ olacak şekilde ilavesi sağlanmıştır. İkinci test çözeltisi eklendikten sonra 30 saniyelik hızlı bir karıştırma işlemi yapılmıştır. Bu aşamada $412\ \text{nm}$ 'de birinci absorbans okuması gerçekleştirilmiştir. Mikropilalar, reaksiyonun sürmesi için 5 dakika daha karışmaya bırakılmış ve bu süre sonunda ikinci absorbans okuması yapılmıştır.

İki okuma arasındaki absorbans farkları alınarak aşağıdaki formüle göre % inhibisyon oranları hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{[(A(K) - A(B)) - (A(\text{İ}) - A(B))]}{(A(K) - A(B))} \times 100$$

B: Blank (İnhibitör bileşik ve substratın eklenmediği kuyucuk)

K: Kontrol (Sadece inhibitör bileşiğin eklenmediği kuyucuk)

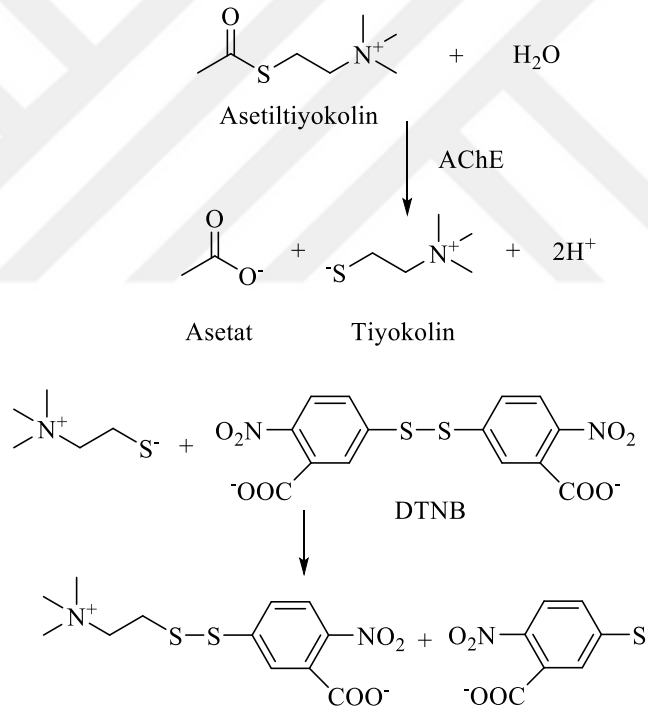
A(B): Blank kuyucuğuna ait absorbans okuma farkı

A(K): Kontrol kuyucuğuna ait absorbans okuma farkı

A(İ): İnhibitör maddelere ait absorbans okuma farkı

Bileşiklerin IC₅₀ değerleri Graphpad Prism (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) programında non-linear regresyon analizinin sigmoid doz-yanıt modeli kullanılarak çizilen inhibisyon eğrilerinden hesaplanmıştır.

Antikolinesteraz Aktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Tez kapsamında sentezi yapılan bileşiklerin kolinesteraz inhibisyon aktiviteleri, 1961 yılında Ellman ve arkadaşları tarafından geliştirilen kolorimetrik metot ile incelenmiştir (Ellman vd., 1961, s. 88). Bu metot gerçekleşen kimyasal reaksiyonla meydana gelen absorbans değişiminin ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Ellman yönteminde AChE enzimi, asetiltiyokolin iyodür substratını asetat ve tiyokolin oluşturarak hidroliz etmektedir. Meydana gelen tiyokolin, spesifik kromojmik belirteci olan DTNB'yi, 412 nm'de absorbans veren nitrobenzoata dönüştürmektedir.



Şekil 4.5. Ellman metodu reaksiyon mekanizması

Tablo 4.3. *Asetilkolinesteraz inhibisyonu sonuçları*

Test numunesi	AChE % İnhibisyon
	250 µg/mL
M1	27,72 ± 0,83
M2	30,63 ± 0,76
Matrin	34,16 ± 0,78
Oksimatrin	23,68 ± 0,40
Donepezil	96,85 ± 1,07
Takrin	98,07 ± 1,18
Galantamin	83,47 ± 1,08

Tablo 4.4. *Butirilkolinesteraz inhibisyonu sonuçları*

Test numunesi	BChE % İnhibisyon
	250 µg/mL
M1	22,05 ± 0,43
M2	23,98 ± 0,48
Matrin	20,49 ± 0,47
Oksimatrin	22,76 ± 0,68
Donepezil	78,62 ± 1,06
Takrin	97,30 ± 1,23
Galantamin	62,37 ± 1,02

4.2.3. Antienflamatuvar aktivitenin belirlenmesi

In Vitro Lipoksijenaz (LOX) Enzim inhibisyon aktivitesi: Aktivite Baylac ve Racine tarafından geliştirilen modifiye spektrofotometrik metot ile uygulanmıştır.

Lipoksijenaz enzimi (1.13.11.12, type I-B, Soybean), linoleik asit ve test maddeleri Sigma (St. Louis, MO, USA)'dan alınmıştır. Potasyum fosfat tampon (1.94 mL; 100 mM; pH 9,0), 40 µL test maddesi solüsyonu ve 20 µL lipoksijenaz enzim solüsyonu hazırlanarak ve 25 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra reaksiyona 50 µL linoleik asit solüsyonu eklenerek 243 nm'de 20. dakikadaki absorbans değişimi

ölçülmüştür. Test maddeleri ve pozitif kontrol olarak kullanılan Nordihidroguairatik asit (NDGA) metanolde çözülmüştür. Bütün kinetik çalışmalar kuvars küvetler kullanılarak yapılmıştır. Test maddelerinin % 50 inhibisyon (IC_{50}) değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 4.5. *Numunelerin % inhibisyon değerleri (mg/mL) (Lipoksijenaz enzim inhibisyonu aktivitesi standart madde (NDGA) konsantrasyon aralığı: 1 mg/mL – 0,05 mg/mL, test numunelerinin konsantrasyonu: 4 mg/mL)*

NUMUNELER	% İNHİBİSYON
Oksimatin (2)	21.11
Matrin (1)	10.47
NDGA (st)	96.35

5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan kaynak taramaları sonucunda daha önce herhangi bir mikrobiyal transformasyon çalışmasında substrat olarak kullanılmayan ve antimikrobiyal, antienflamatuar, kolinesteraz inhibisyonu aktivite gibi biyolojik etkileri araştırılmamış olan matrin (1) ve oksimatrin (2) in Tablo 3.1.'deki 30 farklı mikroorganizma ile biyotransformasyonu denenmiş, oluşan metabolitler İTK yöntemiyle izlenmiş ve SK/KS sistemiyle tanımlanmıştır. Biyotransformasyon süreçleri sonunda oluşan toplam 3 metabolit, Tablo 4.1.'de, Sıvı Kromatografisi Sonuçları Ekler kısmında verilmiştir.

Ön tarama deneyleri sonucunda *Mucor rammanianus* ve *Enterecoccus faecalis* mikroorganizmalarının diğerlerine oranla daha verimli dönüşümlerle M1 ve M2 metabolitlerini ürettiği belirlenmiştir. *Mucor rammanianus* mikroorganizması substrat maddesi olan matrini hidroksilasyona uğratmış ve D halkasını aromitize etmiştir. *Enterecoccus faecalis* ise matrinde yalnızca hidroksilasyona neden olarak M2 metabolitini oluşturmuştur.

Mucor rammanianus ile matrin (1) in preparatif ölçekli biyotransformasyonu gerçekleştirilmiş, oluşan M1 metaboliti pastör pipetiyle oluşturulan kolon ile saflaştırılmıştır. Ayrıca daha sonraki aşamada *in vitro* olarak matrin (1), oksimatrin (2) ve metabolitlerinin antimikrobiyal (antibakteriyel, antikandidal, anti helikobakter, antitüberküloz), antienflamatuar (LOX inhibisyonu) ve kolinesteraz inhibisyonu biyoaktivite testleri gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında matrin (1) ile ilgili herhangi bir biyotransformasyon verisine rastlanmazken, oksimatrin (2) in yapılan bir tez çalışmasında bizim de gerçekleştirdiğimiz oksimatrin (2) -matrin (1) dönüşümünün olduğu görülmüştür.

Mikrodilüsyon yöntemi ile matrin (1), oksimatrin (2) ve metabolitlerinin belirli mikroorganizmalar için antikandidal ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir (Tablo 4.2.).

LOX-5 enzimi inhibisyon deneyinde ise standart madde olan NDGA ile karşılaştırıldığında matrin ve oksimatrinin çok anlamlı bir inhibisyon yapmadığı görülmüştür (Tablo 4.5.).

Ellman metodu ile gerçekleştirilen kolinesteraz inhibisyonu deneylerinde substratımız matrin ve oksimatrinin biyotransformasyon sonucu oluşan metabolitleri ile butirikolinesteraz ve asetilkolinesteraz inhibisyonları kıyaslamalı olarak incelenmiştir.

Bu deneyler sonucunda substratlar ile metabolitlerin kolinesteraz inhibisyonları arasında ciddi bir fark olmadığı, ancak metabolitlerin substratlara göre çok az daha yüksek inhibisyona yol açtığı görülmüştür (Tablo 4.3., Tablo 4.4.).

Kaynak taramaları sonucu M1 ve M2 metabolitlerinin herhangi bir biyotransformasyon ya da sentez sonucunda elde edilmediği görülmüştür. M3 metabolitinin ise oksimatin (2) in yaygın bir metaboliti olan matrin (1) olduğu ortaya konulmuştur. Ancak elde edilen bu veriler dışında kayda değer herhangi bir sonuç alınamamıştır. Bu anlamda matrin (1) ve oksimatin (2) in bu çalışmada seçilen mikroorganizmalar dışında farklı mikroorganizmalarla biyotransformasyonunun denenmesi, yeni matrin (1) ve oksimatin (2) türevlerinin oluşturulmasını sağlayabilecek enzimlerle ilgili çalışmaların sürdürülmesi ve diğer biyolojik özelliklerinin ortaya konması için farklı biyoaktivite testleri uygulanması farklı sonuçlar ortaya çıkarabilir.

Sonuç olarak tanımlanan metabolitler, bu çalışmada belirlenen mikroorganizmalar yardımıyla matrin (1) ve oksimatin (2) den hareketle elde edilerek biyoaktiviteleri açısından değerlendirilebilmiştir. Şu an elde edilen veriler doğrultusunda substratların ve elde edilen metabolitlerin biyolojik olarak umulan *in vitro* biyolojik aktivite seviyesinde olmadığı söylenebilir. İzolasyonu gerçekleştirilen ve çeşitli biyoaktivite çalışmaları yapılan matrin (1), oksimatin (2) ve metabolitlerinin farklı biyoaktivitelerinin ortaya konabilmesi için daha ileri ve detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA

- Cho, C.H., Chuang, C.Y., Chen, C.F. (1986). Biosynthesis of alkaloids. *Planta Medica*, 43, 343.
- Cho, Y.D., Martin, R.O. (1971). Research progress on pharmacology of the alkaloids. *Analytical Biochemistry*, 54, 44-49.
- Dai, Z.J., Gao, J., Ji, Z.Z., Wang, X.J., Ren, H.T., Liu, X.X., Wu, W.Y., Kang, H.F., Guan, H.T. (2009). Matrine induces apoptosis in gastric carcinoma cells via alteration of Fas/FasL and activation of caspase-3. *Journal Ethnopharmacology*, 123, 91-96.
- Demirci, F., (2000). *Biyoaktif Monoterpenlerin Mikrobiyal Transformasyonu*. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognosi Anabilim Dalı, Eskişehir, 23.
- Ding, P.L., Liao, Z.X., Huang, H., Zhou, P., Chen, D.F. (2006). (+)-12a-Hydroxysophocarpine, a new quinolizidine alkaloid and related anti-HBV alkaloids from *Sophora flavescens* A., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16, 1231-1235.
- Ding, T. (2002). The preparing and clinical applications of complex matrin (1) Liniment, *ACTA Chinese Medicine and Pharmacology*, 30(2), 4748.
- Dutta, N.N., Hammar, F., Haralampidis, D., Karanth, N.G. (2001). History and Trends in Bioprocessing and Biotechnology, Springer, Berlin Heidelberg, 5-25.
- Evans W.C. (2008). Trease and Evans Pharmacognosy, Elsevier, 15th edition, England, 333-335.

- Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry*, 66, 137-47.
- Grogan, G. (2009). Biotransformation, microbes and enzymes. *Practical Biotransformations: A Beginner's Guide*, WILEY, İngiltere, 1-8.
- Higashiyama, K., Takeuchi, Y., Yamauchi, T., Imai, S., Kamei, J., Yajima, Y., Narita, M., Suzuki, T. (2005). Implication of the descending dynorphinergic neuron projecting to the spinal cord in the (+)-matrin and (+)-allomatin induced antinociceptive effects. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 28, 845-848.
- Houjin, L., Wenjian, L., Chuanghua, C., Yipin, Z. ve Yongcheng, L. (2006). Biotransformation of limonene by marine bacteria. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 34 (7), 946-950.
- Iverson, C. D. *Identification of Glutathione S-Transferase Inhibiting Natural Products From Matricaria chamomilla and Biotransformation Studies on Oxymatrine and Harmine*. PhD Thesis, Faculty of Graduate Studies of The University of Manitoba, Canada, 2010.
- İşcan, G. (2009). *Bazı Doğal Aromatik Maddelerin Mikrobiyal Transformasyonu ve Biyolojik Etkileri*. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eskişehir, Türkiye, 31.
- Kamei, J., Xiao, P., Ohmia, S. (1997). Antinociceptive effects of (+)-matrin in mice. *European Journal of Pharmacology*, 337(2), 223-226.
- Kinghorn, A.D., Balandrin, M.F., Pelletier, S.W. (1984). Alkaloids. *Chemical and Biological Perspectives*, 2, 105.

- Krishna, P. M., Knv, R., Sandhya, S., Banji, D. (2012). A review on phytochemical, ethnomedical and pharmacological studies on genus *Sophora*, Fabaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(5), 1145-1154.
- Leuenberger, H.G.W. (1990). Biotransformation-a useful tool in organic chemistry. *Pure & Applied Chemistry*, 62(4), 753-768.
- Li, Z., Zheng, L., Shi, J., Zhang, G. (2015). Toxic Markers of Matrin (1) e Determined Using ¹H-NMR-Based Metabolomics in Cultured Cells *in vitro* and rats *in vivo*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 11, 97-99.
- Long, Y., Lin, X. T., Zeng, K. L., Zhang, L. (2004). Efficacy of intramuscular matrin (1) e in the treatment of chronic Hepatitis B. *Hepatobiliary Pancreatic Diseases International*, 3, 69-72.
- Loughlin, W.A. (2000). Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource Technology*, 74, 49-62.
- Ma, L.D., Wen, S.H., Zhan, Y., He, Y.J., Liu, X.S., Jiang, J.K. (2008). Anticancer effects of the Chinese medicine matrin on murine hepatocellular carcinoma cells. *Planta Medica*, 74, 245-251.
- McNaught A.D. and Wilkinson A. (1997). Compendium of Chemical Terminology. Oxford, Second edition, 156.
- Mega, M.S., Cummings, J.L., O'Connor, S.M. (2001). Cognitive and metabolic responses to metrifonate therapy in Alzheimer disease. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol*, 14, 63-8.
- Nowacki, E., Waller, G.R. (1977). Review Latinoamer. *Quimica*, 8, 49-56.

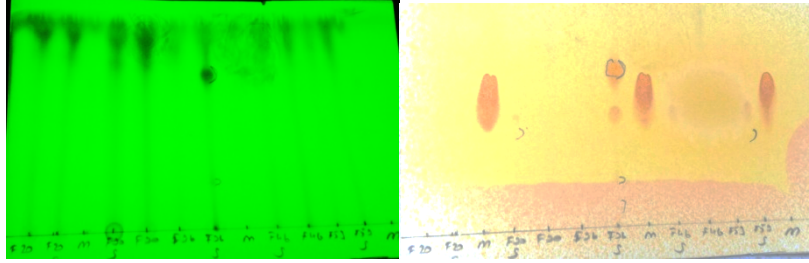
- Schewe, H., Mirata, M.A., Holtmann, D., Schrader, J. (2011). Biooxidation of monoterpenes with bacterial monooxygenases. *Process Biochemistry*, 46, 1885–1899.
- Schultes, R.E., Hoffman, A. (1980). Pflanzen der Götter. Hallwag. Bern, Stuttgart, 87-94.
- Schütte, H.R. (1969). In: Biosynthese der Alkaloide. (Mothes, K., Schütte H.R.. eds.), VEB, Berlin, 324.
- Shi, Y., Shen, G., Fang, H., Xu, C., Hu, S. (2015). Method for quantitative determination of matrin (1) e in *Sophora alopecuroides* L. and its inhibitory effect on breast cancer MCF-7 cell proliferation. *Biomedical Research*, 26(3), 461-466.
- Wing M. (1984). Stoffwechsell und Function von Chinolizidinal-alkaloiden in Pflanzen und Pflanzlichen Zellkulturen. *Habilitation-Thesis Technische Universität Braunschweig*, 56-59.
- Wippich, C., Wing, M. (1985). Biological properties of alkaloids. Influence of quinolizidine alkaloids and gramine on the germination and development of powdery mildew, *Erysiphe graminis f. sp. hordei*. *Experientia*, 41, 1477-1478.
- Zhang, G., Jiang, L., Zhang, L. (2015). Anti-tumor effect of matrine combined with cisplatin on rat models of cervical cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8, 1055-1059.
- Zhou J, Mei Y, Yi L. (2008). Research progress on pharmacology of the alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. *Journal of Pediatric Pharmacology*, 14, 61-64.
- Zhou, Y., Wu, Y., Deng, L., Chen, L. (2014). The alkaloids matrin (1) e of the root of *Sophora flavescens* prevents arrhythmogenic effect of ouabain. *Phytomedicine*, 21(7), 931-935.

Zhu, Ningx. (2001). Study on inducing and differentiating function and mechanism of matrin (1) e onleukemia cells. *ACTA Traditional Chinese Medicine and Pharmacology (Shanghai)*, 15(1), 4344.

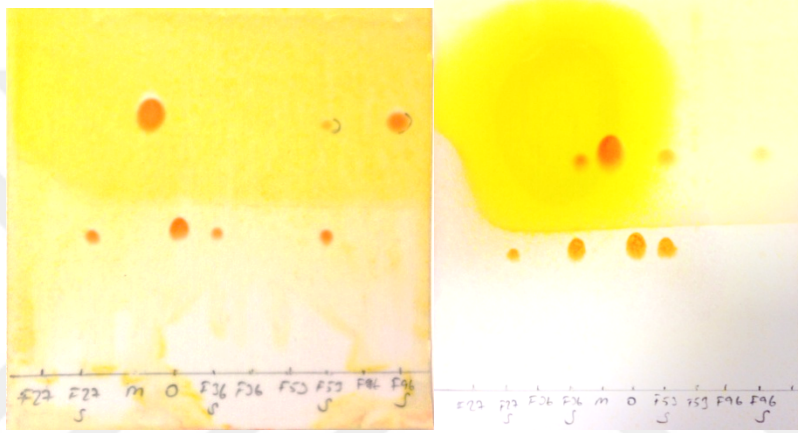


EKLER

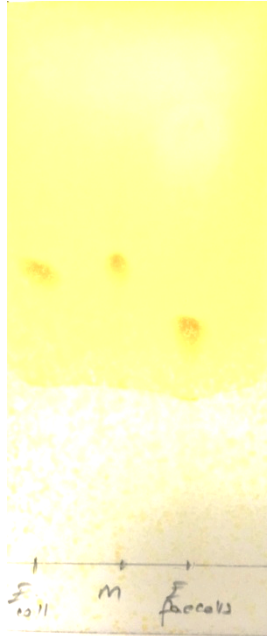
Ön Tarama Deneyleri (İTK sonuçları)



Mucor rammanianus metaboliti



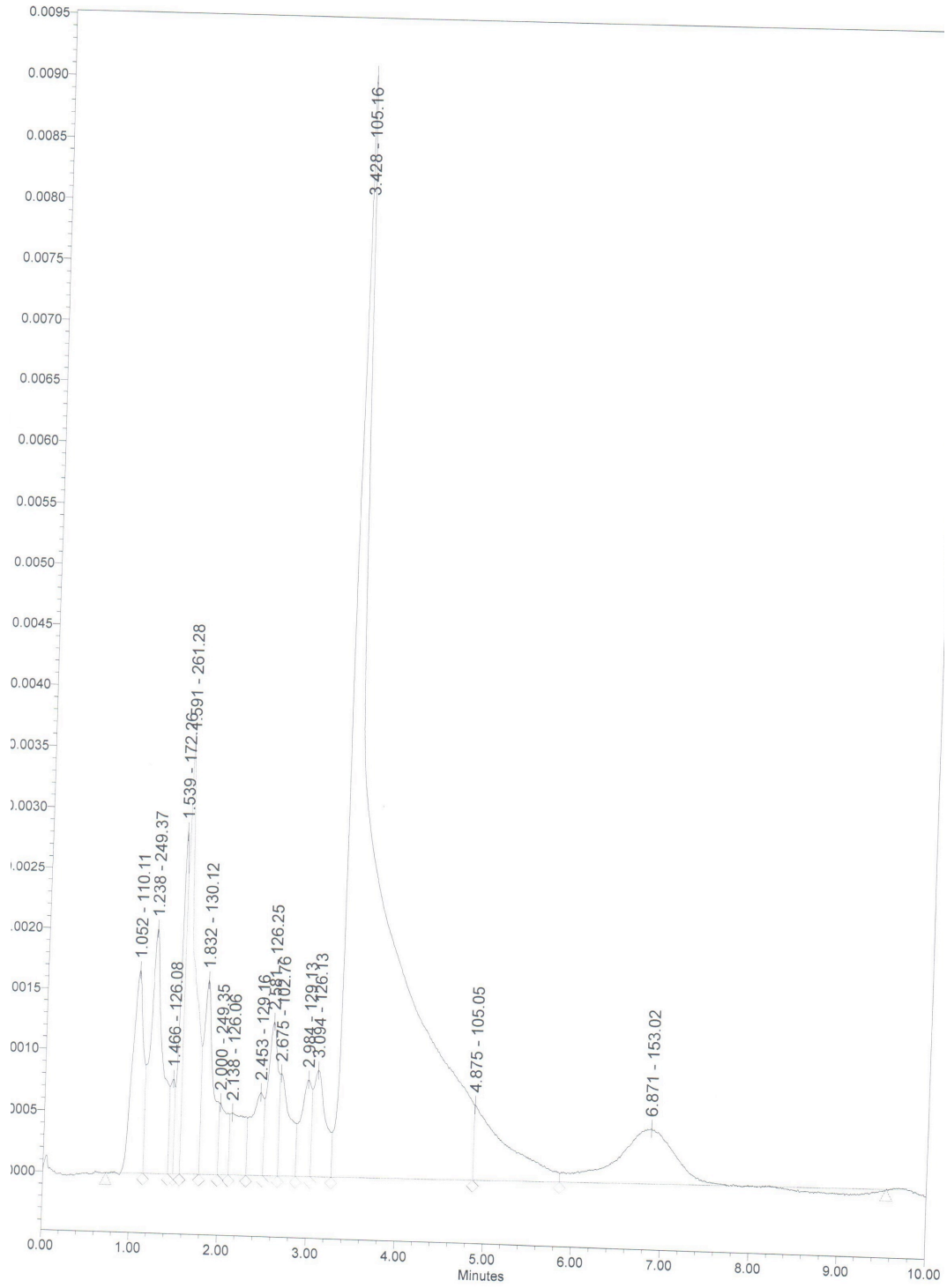
Oksimatrın (2) in çeşitli mikroorganizmalarla matrin (1) e dönüşümü



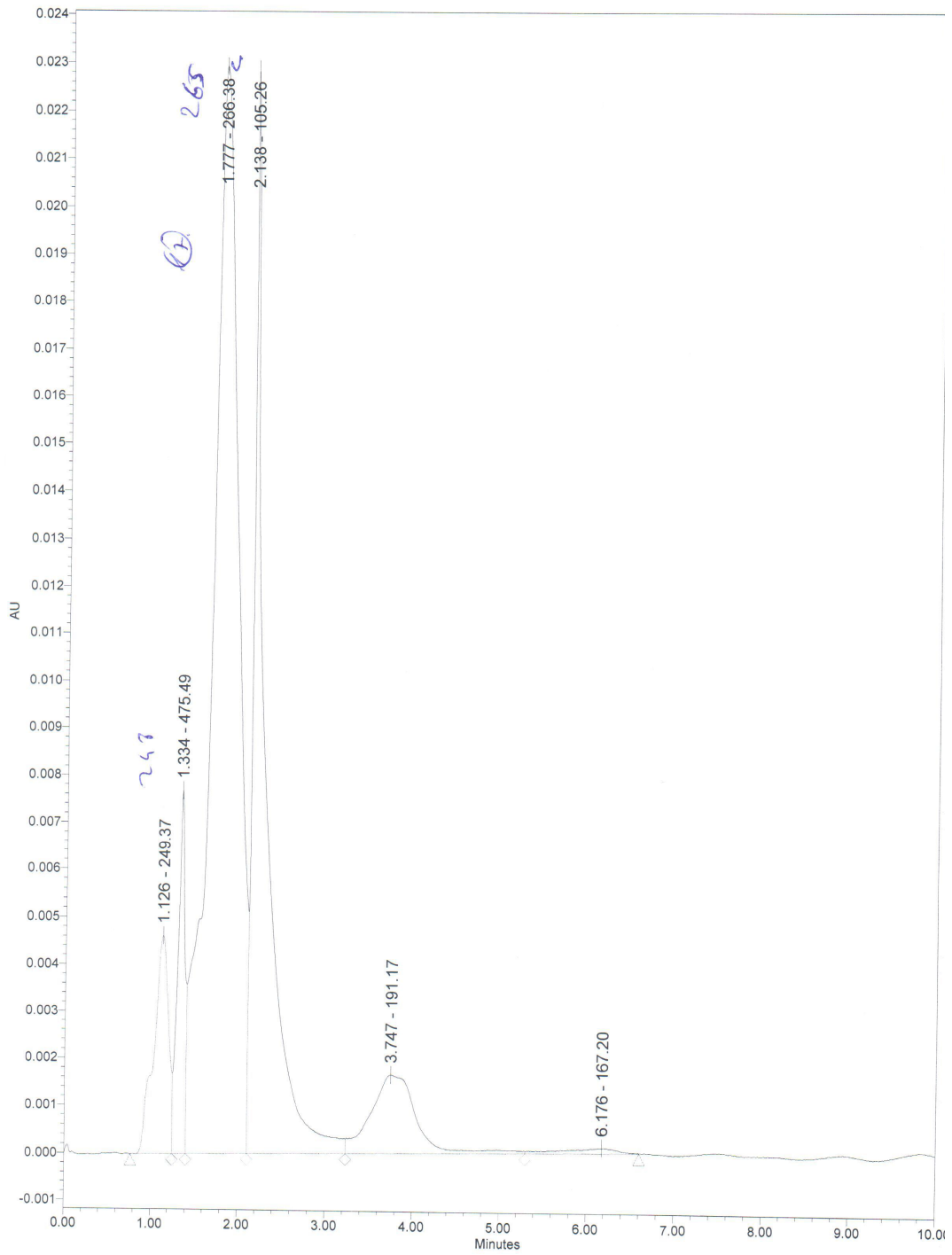
Enterococcus faecalis ile matrin (1) in metabolitine dönüşümü

Sıvı Kromatografisi Sonuçları

M1



M2



ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Ayşe Esra KARADAĞ
Yabancı Dil : İngilizce
Doğum Yeri ve Yılı : İstanbul / 17.03.1989
E-posta : ayseesraguler@gmail.com

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2002, Mehmet Akif İlköğretim Okulu
- 2006, Yenibosna Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi
- 2014, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
- 2014-Halen devam eden, İstanbul Medipol Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi

Bilimsel Faaliyetleri:

- 2017, Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiri, “Chemical characterization of *Phlomis kurdica* Rech. Fil. essential oil from Turkey”, Karadag A.E., Demirci B., Demirci F., Baser H.C., International Symposium on Advances in Lamiaceae Science 2017, Antalya.
- 2016, Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiri, “Phytochemical Composition and In Vitro Lipoxygenase Inhibition of *Phlomis russeliana*, *P. rigida* and *P. pungens* Extracts”, Karadag A.E., Kultur S., Demirci F., 29th International Symposium on the Chemistry of Natural Products (ISCNP-29) and the 9th International Conference on Biodiversity (ICOB-9), İzmir.
- 2016, Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiri, “*Phlomis rigida*, *Phlomis pungens* ve *Phlomis russeliana* Toprak Üstü Ekstrelerinin Antibakteriyel ve Anti-Helikobakter Piloni Aktiviteleri”, Karadag A.E., Karaca N., Coban Z., Demirci F., Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (BİHAT), Trabzon.

- 2016, Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiri, “Oxymatrine biotransformation by microorganisms and the effects of 5-lipoxygenase inhibitor activity evaluation”. Demirci F., Karadag A.E., Guzel M., 9th Joint Natural Products Conference, Copenhagen.

