

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASCIDIACEA SINIFINA DAHİL *Microcosmus vulgaris*' DEN BİYOAKTİF ETKEN
MADDE İZOLASYONU VE YAPI TAYİNİ

Melek Sertdemir

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Belma Konuklugil

Mart

2017

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.



Melek Sertdemir

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Belma Konuklugil danışmanlığında Melek Sertdemir tarafından hazırlanan bu çalışma 21.03.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Belma Konuklugil

İmza:

Üye: Prof. Dr. Didem Deliorman Orhan

İmza:

Üye: Doç. Dr. Erkan Yılmaz

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Ascidiacea sınıfına dahil *Microcosmus vulgaris*' den biyoaktif etken madde izolasyonu ve yapı tayini

Melek Sertdemir

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Belma Konuklugil

Doğal kaynaklı etkili maddelerin eldesi, farmasötik endüstrisinde kullanılmak üzere üretilecek bileşiklerin ilk adımıdır. Bu amaçla elde edilen birçok doğal kaynaklı etkili madde, yapılan uzun çalışmalar sonucu, hastalıklara çözüm olacak ya da kozmetik olarak kullanılabilecek ürünlere dönüşmüştür. Bitki kaynaklı doğal ürünlerin yanı sıra, yeni bir alan olan deniz kaynaklı doğal ürünlerin araştırılması birçok farklı bileşiğin keşfini de beraberinde getirmiştir. Deniz kaynaklı olarak izole edilen ve ilaç haline dönüştürülen Prialt®, Lovaza®/Omacor®, Halaven®, Adcetris®, Carragelose® bunlardan bazılarıdır (1). Yondelis ® ilacının etken maddesi olan trabektedin kanser tedavisinde kullanılan ve bir tunikat olan *Ecteinascidia turbinata*' dan izole edilmiş bir bileşiktir (2). Aplidin® ve Lurbinektedin 173' de yine tunikat kaynaklı ve sırasıyla Faz III ve Faz I/II çalışmaları devam eden kanser ilacı adaylarıdır (3).

Bu çalışmada Kordalılar şubesine ve Ascidae sınıfına dahil bir tunikat olan *Microcosmus vulgaris* ile çalışılmıştır. Bu amaçla biyoaktivite (Sitotoksik, antioksidan, antimikrobiyal ve asetilkolinesteraz inhibisyon biyoaktiviteleri) ve izolasyon çalışmaları yapılmıştır.

Kloroform-metanol (1:1) ile ekstre hazırlanmıştır. Hazırlanan bu ekstre sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulmuştur. n- bütanol fazı alınmış ve vakum sıvı kromatografisine uygulanmıştır. Buradan alınan 2. fraksiyon kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Buradan alınan ürün NMR'a verilmiş ve yapı 5 α - 6 α - epoxyergosta 7-en- 3 β - ol olarak tespit edilmiştir.

Ham ekstrenin Hep-2 hücreleri (Human epidermoid cancer cells)' ne karşı sitotoksik aktivitesi incelenmiş ve IC₅₀ değeri 40.0754 μ g/ ml olarak tespit edilmiştir. Antioksidan aktivitesi ise

süperoksit radikali süpürücü aktivitesi ölçülerek yapılmış ve 800 µg/ ml konsantrasyonda % 10'un altında bir aktivite göstermiştir. Bu sebeple SO radikal süpürücü etkisi yok denecek kadar azdır. İzole edilen 5α- 6α- epoxyergosta 7-en- 3β- ol'un de antioksidan etkisine bakılmıştır. Bileşiğin aktivitesi, ham ekstreninkinden fazla olsa da dikkate değer bir aktivite bulunmamıştır. Ham ekstrenin, antibakteriyal ve antifungal aktivitesine bakılmıştır. Ekstrenin, *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002, *Staphylococcus aureus* JCSC 4744, *Cryptococcus neoformans* NIH 68, *Cryptococcus gattii* NIH 112 türlerine karşı düşük seviyede antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür. Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi ölçülmüş ve ham ekstrenin inhibisyon aktivitesinin % 40'ın altında kalması nedeniyle inaktif olduğu görülmüştür.

2017, 68 sayfa

Anahtar kelimeler: Deniz kaynaklı doğal etkili maddeler; tunikatlar; *Microcosmus vulgaris*

ABSTRACT

MSc Thesis

Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites from sea squirt

Microcosmus vulgaris

Melek Sertdemir

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Belma Konuklugil

Isolation of natural products is the very first step for a product which can be apply to pharmaceutical industry. For this purpose, lost of natural products have been isolated and with long time studies they became products to use as pharmaceuticals, cosmetics, nutritional supplements, molecular probes, fine chemicals and agrochemicals (4). Isolation of natural products from marine organisms is a new trend in the world and especially in Turkey. In recent years, a significant number of novel metabolites with potent pharmacological properties has been discovered from the marine organisms (1). Attention has been focused more recently on ascidians because of their biologically active metabolites (5). Trabectedin is a novel alkaloid and the active substance of Yondelis® which is isolated from a tunicate *Ecteinascidia turbinata*. Trabectedin was found to be especially effective against solid tumors. Aplidin® and Lurbinectedin 173 are compounds isolated from tunicates *Aplidium albicans* and *Ecteinascidia turbinata* that still in Phase III and Phase II studies for cancer treatment (6). Ascidians have a great potential to be discovered by scientists.

Microcosmus vulgaris collected by scuba-diving by Dr. Bülent Gözcelioğlu from Aegean Sea. Sample was cut into small pieces and homogenized and extracted with chloroform- methanol (1:1). This extract was then subjected to repeated column chromatography, to obtain steroids. Isolation of 5- 6- Epoxy sterol from n- butanol fraction was done by coloumn chromatography with using silica gel as stationary phase and dicholoromethane- methanol with gradient elution as mobile phase. Initial analysis for compound done by Thin Layer Chromatogrphy (TLC).

Structure elucidation of 5 α - 6 α - epoxyergosta 7-en- 3 β - ol was done by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy.

Cytotoxicity of *M. vulgaris* extract against Hep-2 cell line was determined with MTT method. IC₅₀ value of extract determined as 40.0754 μ g/ ml. Antioxidant activity of extract determined with radical scavenging activity. Extract showed under 10% of activity at 800 μ g/ ml concentration. Antioxidant activity of 5 α - 6 α - epoxyergosta 7-en- 3 β - ol was more than crude extract but again not very high. According to antimicrobial activity assay, extract showed low activity againsts *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002, *Staphylococcus aureus* JCSC 4744, *Cryptococcus neoformans* NIH 68, *Cryptococcus gattii* NIH 112. Extract revealed to be inactive on the AChE inhibition assay.

2017, 68 pages

Keywords: Marine natural products; tunicates; *Microcosmus vulgaris*

TEŞEKKÜR

Geçen her yılda biyoteknolojinin Dünya' da ve Türkiye' de öneminin arttığı ve değerinin farkedildiği kuşkusuz. Bu sebeple, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü' nün bir parçası olmak benim için bir gurur ve mutluluk kaynağıdır. Türkiye' de yeni sayılacak bir konu olan deniz kaynaklı etken maddelerin araştırılması konusu beni ile tanıştıran, sadece ulusal düzeyde değil uluslararası düzeyde de bu çalışmamı yürütmemi sağlayan, projesinde bana yer veren ve her aşamada desteklerini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi A.B.D. öğretim üyesi çok değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Belma Konuklugil'e,

Bu dönem içerisinde tanışmış olduğum ve çalışmaktan zevk aldığım sevgili arkadaşlarım, Özge Demir, Serdar Korpayev ve Erdi Can Aytar' a,

Bize tüm kaynaklarımızı sağlayan ve deniz canlılarının dünyasını bize tanıtan Dr. Bülent Gözcelioğlu' na,

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi A.B.D.' ye proje kapsamında gelmiş olan ve deneyimlerini bizden esirgemeyen Honglei Li ve Gangming Xu'a,

Ankara Üniversitesi Farmastik Kimya A.B.D. öğretim üyesi Prof. Dr. Gülgün Kılıçgil'e,

Projemizin İtalya ayağını yürüten Dr. Emiliano Manzo ve ekibine,

Çalışmalarım esnasında her konuda yardım ve desteğini hissettiğim isimlerini burada saymadığım tüm arkadaşlarıma,

Bu çalışmamı gerçekleştirdiğim süre boyunca her türlü yakınmamı dinleyen, yapabileceği her şey için bana destek olan, varlığını her zaman hissettirerek bana güç veren Oğuzhan Ödenekli'ye,

Her zaman yanımda olan, hep bir adım ileri gitmeme yardımcı olan, biricik ailem; ablama anne ve babama,

Son olarak, yüksek lisans dönemim boyunca dahil olduğum 113Z837 'Chemical and Ecological Study of Some Turkish Coasts Benthic Invertebrates' başlıklı projede bursiyer olarak bana mali destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	1
SEKİLLER DİZİNİ.....	4
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	7
SİMGELER DİZİNİ	8
1. GİRİŞ	10
2. KURAMSAL TEMELLER.....	12
2.1. DENİZ KAYNAKLI DOĞAL ETKİLİ MADDELER.....	12
2.2. KORDALILAR ŞUBESİ.....	15
2.3. TUNİKATLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ	16
2.4. TUNİKATLARIN DÜNYA'DAKİ VE TÜRKİYE'DEKİ DAĞILIMLARI.....	20
2.5. TUNİKATLARIN KİMYASAL İÇERİĞİ	22
2.6. TUNİKATLARDAN İZOLE EDİLMİŞ BİLEŞİKLER	23
2.6.1. ASCİDİDEMİN.....	23
2.6.2. APLİDİN (DEHİDRODİDEMİN B)	23
2.6.3. DİAZONAMİT A	24
2.6.4. DİDEMİN B	25
2.6.5. ECTEİNASCİDİN 743 (TRABEKTEDİN)	25

2.6.6. VİTİLEVUAMİT	26
2.7. MICROCOSMUS VULGARIS' DEN İZOLE EDİLEN BİLEŞİKLER VE BİYOAKTİVİTELERİ ..	27
<u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u>	30
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	31
4.1. MATERYAL	31
4.1.1. <i>MICROCOSMUS VULGARIS</i>	31
<i>MICROCOSMUS VULGARIS</i> 'İN SINIFLANDIRMASI AŞAĞIDAKİ GİBİDİR.	31
4.1.2. KULLANILAN KİMYASALLAR VE MATERYALLER	32
4.2. YÖNTEM.....	33
4.2.1. <i>MICROCOSMUS VULGARIS</i> ' DEN EKSTRENİN HAZIRLANMASI	33
4.2.2. EKSTRENİN SIVI- SIVI EKSTRAKSİYON İLE FRAKSİYONLANMASI	34
4.2.3. ETKEN MADDEİNİZOLASYONU	35
4.3. BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI	40
4.3.1. HEP-2 HÜCRELERİNDE DİZİLERİ ÜZERİNDE SİTOTOKSİK ETKİ İNCELEMESİ.....	40
4.3.2. RADİKAL SÜPÜRÜCÜ ETKİ İNCELEMESİ	40
4.3.3. ANTİMİKROBİYAL ETKİ	41
4.3.4. ASETİLKOLİN ESTERAZ İNHİBİSYON AKTİVİTESİ.....	42
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	43
5.1. 5A- 6A- EPOKSİERGOSTA 7-EN- 3B- OL'ÜN İZOLASYONU	43
5.1.1. BÜTANOL FRAKSİYONUN YBSK SONUCU	43
5.1.2. VSK-2'NİN VE FRAKSİYONLARININ İTK ANALİZİ	44
5.1.3. MADDEİNİN NMR ANALİZ SONUÇLARI	48
5.2. BUOH VSK- 2.1, 2.1 VE 301 NO' LU FRAKSİYONLARININ GC-MS SONUÇLARI	52

5.3. BUOH VSK-3 FRAKSİYONU YBSK SONUCU VE OLASI MOLEKÜLLER...	55
5.4. ETİL ASETAT VSK-4 FRAKSİYONU YBSK SONUCU VE OLASI MOLEKÜLLER.....	56
5.5. BİYOAKTİVİTE SONUÇLARI.....	56
5.5.1. SİTOTOKSİK AKTİVİTE DENEY SONUCU	56
5.5.2. SÜPEROKSİT RADİKAL SÜPÜRÜCÜ AKTİVİTE DENEY SONUCU	57
5.5.3. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE SONUCU.....	58
5.5.4. ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİSYON AKTİVİTESİ SONUCU.....	60
<u>6. TARTIŞMA VE SONUC.....</u>	<u>61</u>
<u>7. KAYNAKLAR</u>	<u>63</u>
<u>8. ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>67</u>
<u>9. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR</u>	<u>68</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. (a) Notokord (b) Dorsal tübüler sinir şeridi (c) Faringeal cepler (d) Endostil (e) Postanal kuyruk (14).....	17
Şekil 2.2 Bir tunikatın genel yapısı (14).....	18
Şekil 2.3 Larval bir tunikatın yetişkinliğe metamorfozla geçişi (14).....	19
Şekil 2.4 Tunikatların dünya üzerindeki tür sayısı dağılımları (15).....	20
Şekil 2.5 Kordalılara (CHO) dahil canlıların Türkiye'deki bölgelere göre tür sayısı (11) .	21
Şekil 2.6 Ascididemnin' in yapısal formülü (17).....	23
Şekil 2.7 (a) Aplidium albicans (19) ve (b) Aplidinin kimyasal yapısı (18).....	24
Şekil 2.8 Diazonamitin kimyasal yapısı (21)	24
Şekil 2.9 Didemnin B' nin kimyasal yapısı (22).....	25
Şekil 2.10 Trabektedinin kimyasal yapısı (24).....	26
Şekil 2.11 Vitilevuamitin kimyasal yapısı (28).....	27
Şekil 2.12. Sulkatinin kimyasal formülü (29)	27
Şekil 2.13 Sulkatinin IC ₅₀ (µg/ ml) değeri (29).....	28
Şekil 2.14 Sulkakeramit (a) ve sulkakeramit perasetatın (b) yapıları ve (b)'nin GC-MS analizi ile elde edilen yağ açılı ve sfinganin içeriklerini gösterir bilgiler (30).....	28
Şekil 2.15 <i>Microcosmus sulcatus</i> 'dan izole edilen bileşiklerin yapısı ve ön işlemden geçirilmiş fraksiyonların GC- MS sonuçları (31).....	29
Şekil 4.1 (a) Toplanma bölgesi (b) <i>Microcosmus vulgaris</i> (40).....	31
Şekil 4.2 Örneğin kesilmesi ve çözücü içinde bekletilmesi	33
Şekil 4.3 Çözücünün evaporatör ile uçurulması.....	33

Şekil 4.4 Ekstrenin sıvı- sıvı ekstraksiyon ile fraksiyonlanması.....	34
Şekil 4.5 Sıvı- sıvı ekstraksiyon ile organik faz ve su fazının ayrılması	35
Şekil 4.6 Vakum sıvı kromatografi ile fraksiyonlama.....	36
Şekil 4.7 Kolon kromatografisi ile VSK-2'nin fraksiyonlanması.....	38
Şekil 4.8 İzolasyon şeması.....	39
Şekil 5.1 Bütanol fraksiyonu YBSK sonucu	43
Şekil 5.2 BuOH fazından alınan VSK- 2'nin İTK analizi.....	44
Şekil 5.3 27-68 no'lu fraksiyonların anisaldehit boyaması sonrası görünümü	45
Şekil 5.4 27- 68 no'lu fraksiyonların İTK sonuçları	46
Şekil 5.5 Sefadeks kolondan alınan fraksiyonların İTK sonucu	47
Şekil 5.6 Sefadeks kolondan alınan fraksiyonların Hekzan-DCM-EtOAc (1:10:1) yürütülmesi ile elde edilen İTK sonucu.....	47
Şekil 5.7 ¹³ C NMR sonucu	48
Şekil 5.8 ¹ H NMR sonucu	49
Şekil 5.9 5α- 6α- epoksiergosta 7-en- 3β- ol 'ün yapısı	50
Şekil 5.10 Stearik asitin yapı formülü (37)	53
Şekil 5.11 Palmitik asit yapı formülü (38)	53
Şekil 5.12 Miristik asit yapı formülü (39).....	53
Şekil 5.13 BuOH VSK- 2.1, 2.1 ve 301 no' lu fraksiyonların GC-MS sonuçları	54
Şekil 5.14 BuOH VSK-3 YBSK sonucu	55
Şekil 5.15 EtOAc VSK-3 YBSK sonucu	56

Şekil 5.16 Sitotoksik aktivite deney sonucu.....	57
Şekil 5.17 Süperoksit radikal süpürücü aktivite sonucu.....	57
Şekil 5.18 5 α - 6 α - epoxyergosta 7-en- 3 β - ol' ün süperoksit radikali süpürücü aktivite sonucu	58
Şekil 5.19 24 saat sonunda plakanın görünümü	59



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Hayvanlar için karşılaştırmalı izolasyon ve yayın çalışmaları (10)	12
Çizelge 2.2 Deniz canlılarından izole edilen bazı bileşikler ve kaynak canlının şubesi (10)	14
Çizelge 2.3 Tunikatların dünya üzerindeki bazı bölgelerde tür zenginliği (14).....	20
Çizelge 2.4 Tunikatların Türkiye’ deki tür dağılımı ve bulunduğu bölgeler (11).....	21
Çizelge 4.1 YBSK analizinde kullanılan çözücü sistemi	36
Çizelge 4.2 VSK’ da kullanılan elüsyon sistemi ve kullanılan toplam miktar.....	37
Çizelge 5.1 Maddenin ¹³ C ve ¹ H datası	50
Çizelge 5.2 GC-MS analiz sonuçları	53
Çizelge 5.3 Ekstrenin minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri	59

SİMGELER DİZİNİ

μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
AA	Askorbik asit
AchE	Asetilkolinesteraz enzimi
n-BuOH	n- Bütanol
C18	Karbon 18
$^{\circ}$ C	Derece Santigrat
Ca	Kalsiyum
cfu	Koloni sayısı (colony formit unit)
CHCl ₃	Kloroform
¹³ C NMR	Karbon Nükleer Manyetik Rezonans
cm	Santimetre
DCM	Diklorometan
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DTNB	5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)
EtOAc	Etil asetat
FAME	Yağ asiti metil esterleri
GC-MS	Gaz kromatografisi-Kütle Spektroskopi
H ₂ O	Su
Hex.	Hekzan
HEp-2	İnsan epitelyal tip 2
¹ H NMR	Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans
IC ₅₀	İnhibisyon konsantrasyonu 50%

İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
L1210	Mürin lösemi hücrelerine
MeOH	Metanol
<i>Microcosmus</i>	<i>M. vulgaris</i>
<i>vulgaris</i>	
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
mg	miligram
mL	Mililitre
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol -2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromit
NBT	Nitromavi tetrazolyum
nm	Nanometre
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PBS	Fosfat tamponlu salin
SDA	Sabouraud Dekstroz Agar
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SO	Süperoksit
UV	Ultraviyole
VSK	Vakum Sıvı Kromatografisi
YBSK	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ

Dünya'mızın uzaydan çekilen görüntülerine bakıldığında en başta göze çarpan ve büyük bir bölümünü kaplayan şeyin su olduğu görülür. Bu suyun ise % 95'ini okyanuslar oluşturur (7). 'World Register of Marine Species (WoRMS)'in veritabanına bakıldığında 226, 248 deniz canlısı türü tespit ve kabul edilmiş durumdadır (8). Duruma bu şekilde bakıldığında, okyanuslar üzerinde yapılacak çalışmalar karada yapılacak çalışmalara göre çok daha fazla olmalıdır.

Doğal kaynaklı ürünler, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi biyolojik bir kaynak tarafından üretilen ve sadece belirli bir taksonomik aile, cins, tür ya da bir organizmaya has olan moleküllerdir. Primer metabolitler canlının büyümesi, gelişmesi ve üremesinde görev alırken, sekonder metabolitler organizmanın normal büyümesi, gelişimi ve üremesinde birincil bir göreve sahip değildirler. Sekonder metabolitler, organizma tarafından genellikle avcıya karşı direnç, yer ya da yiyecek için rekabete dayalı durumlar, çiftleşme için iletişim, avlanma, quorum sinyalleşme gibi ekolojik ilişkilerde kullanılan moleküllerdir. (1). Canlının ürettiği bu bileşikler, yoğun araştırmalar sonucunda hastalıkların tedavisinde ya da kozmetik endüstrisinde kullanılabilecek ürünlerin temelini oluştururlar. Örneğin, meme kanserinin tedavisinde çok yaygın olarak kullanılan paklitaksel (Taxol®), pasifik porsuk ağacı olarak bilinen *Taxus brevifolia*' dan; Estée Lauder' in cilt bakım ürünü olan Resilience® da ise yaşlanma karşıtı olarak kullanılan pseudopterosinler bulunur ve gorgonion mercanı olan *Pseudopteroorgia*' dan izole edilmiştir (4,9).

Deniz kaynaklı sekonder metabolitlerin de sahip olduğu anti-tümör, anti-proliferatif, fotoprotektif, antibiyotik ve antimetabolik aktiviteler gibi aktiviteler farmasötik endüstrisi için her geçen gün daha fazla ilgi çekici bir saha haline gelmiştir. Aynı trendleri takip ederek kozmetik endüstrisi için de deniz yeni bileşiklerin keşfi için uygun bir alan haline gelmiştir. Deniz kaynaklı olarak izole edilen ve ilaç haline dönüştürülen Prialt®, Lovaza®/Omacor®, Halaven®, Adcetris®, Carragelose® bunlardan bazılarıdır (1).

Çalışılan türlerin % 38' ini Süngerler, % 20' sini Mercanlar, % 14' ünü Yumuşakçalar ve % 10' unu Derisidikenliler oluşturmaktadır. Yani incelenen türlerin büyük kısmı bu dört filumdan oluşmaktadır. Tunikatların da dahil olduğu Kordalılar 21 517 türe sahip olmasına rağmen, yapılan çalışmalar oldukça azdır (10). Bunun yanında deniz canlılarından ilaç olarak

kullanıma sunulan ilk ilaç olan Yondelis® ilacının etken maddesi olan trabektedin kanser tedavisinde kullanılan ve bir tunikat olan *Ecteinascidia turbinata*'dan izole edilmiş bir bileşiktir (2). Aplidin ve Didemnin B'de yine tunikat kaynaklı ve faz çalışmaları devam eden potansiyel birer kanser ilacıdır. Deniz kaynaklı yeni bileşiklere bakıldığında, tunikat kaynaklı yeni bileşikler yüksek bir paya sahip değildir (5).

Ülkemiz denizlerinde; Marmara Denizi 35, Karadeniz 7, Ege Denizi 40, Akdeniz 36 türe ev sahipliği yapmaktadır. Türkiye'de, tunikatların da dahil olduğu Kordalılar filumu 64 farklı türü barındırarak yassı solucanlardan sonra ikinci sırada yer alır. Bu 64 tür içerisinde ise 61 türle tunikatlar alt-filumu en büyük sayıya sahiptir (11).

Üç tarafı denizlerle çevrili olan ülkemizde deniz kaynaklı sekonder metabolitler ve bunların biyoaktiviteleri ile ilgili çalışmalar oldukça azdır. Bu çalışmalar deniz algleri ile başlamış olup son yıllarda diğer deniz canlılarının da araştırılmasına başlanmıştır (12).

Türkiye'de deniz kaynaklı olarak yapılan çalışmaların içinde tunikatlarla yapılan çalışmaların sayısı oldukça azdır. Bu kapsamda yapılan çalışma, ascidiacea sınıfı ile yapılan ilk izolasyon çalışmasıdır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Deniz Kaynaklı Doğal Etkili Maddeler

Karasal ve deniz kaynaklı ekstrelerin ilaç, narkotik ya da zehir olarak kullanımı ilkel toplumlara kadar dayanır (10). Deniz kaynaklı doğal ürünler, son 75 yılda ortaya çıkmış bir konudur. Bu tarih, doğal kaynaklı etkili maddelerin ortaya çıktığı ondokuzuncu yüzyıla oldukça uzak bir zamandır. Örneğin 1804 yılında Almanya’da haşhaş bitkisinden saflaştırılmıştır. Bergman’ın 1930 ve 1940’larda birkaç filum ile yaptığı çalışmaların ardından, denizin yeni ve biyoaktif bileşikler için zengin bir kaynak olarak tanınması artarak devam etmiştir. Faulkner bu alandaki ilk liderlerden biridir ve 1975’de deniz kaynaklı etkili maddeler: marin toksinler, deniz kaynaklı doğal ürünler kimyası ve deniz kimyasal ekolojisi alanlarının paralel alanlar olduğunu belirtmiştir.

Denizler oldukça geniş bir biyoçeşitliliğe sahip ve oldukça kompleks bir çevredir. Birçok deniz kaynaklı etkili maddenin deniz canlılarının dokularında olduğu ve bu sebeple o canlıya has ürünler olduğu artık biliniyor. Bununla beraber daha birçok ürün, o canlı ile endo- ya da epibiyotik ilişki içinde olan mikroorganizmalarca da üretiliyor.

Denizin bir kaynak olarak zenginliğini daha iyi anlayabilmek için Çizelge 2.1’ de canlılardan izole edilen madde sayısı ve yapılan yayınların sayısı verilmiştir (10).

Çizelge 2.1 Hayvanlar için karşılaştırmalı izolasyon ve yayın çalışmaları (10)

<i>Taksa</i>	Marin türleri	Yeni bileşik izole edilen türler	Çalışılan türler	İzole edilen bileşikler	Yeni bileşiklerle ilgili çıkan yayınlar	Toplam yayınlar
Hayvanlar						
Acanthocephala	600	–	–	–	–	–
Annelida	12148	14	52	48	25	90
Arthropoda	47217	9	77	11	10	88
Brachiopoda	550	–	2	–	–	2
Bryozoa	5700	28	77	172	75	334

Çizelge 2.1 (Devam)

Cephalorhyncha	156	–	–	–	–	–
Chaetognatha	121	–	–	–	–	–
Chordata	21517	184	475	957	396	1513
Cnidaria	9795	415	806	3909	1307	2545
Ctenophora	166	–	–	–	–	–
Cycliophora	1	–	–	–	–	–
Echinodermata	7000	205	407	1172	446	852
Echiura	176	–	–	–	–	–
Gastrotricha	395	–	–	–	–	–
Gnathostomulida	97	–	–	–	–	–
Hemichordata	106	3	18	29	12	68
Kamptozoa	170	–	–	–	–	–
Mesozoa	106	–	–	–	–	–
Mollusca	52 525	201	587	1046	459	1729
Nematoda	12 000	2	7	2	3	9
Nematomorpha	5	–	–	–	–	–
Nemertea	1200	–	1	–	–	7
Onychophora	0	–	–	–	–	–
Phoronida	10	–	–	–	–	–
Placozoa	–	–	–	–	–	–
Platyhelminthes	15 000	2	8	2	2	63
Porifera	5 500	878	1554	7024	2686	6296
Rotifera	50	–	–	–	–	–
Sipuncula	144	–	–	–	–	–
Tardigrada	212	–	–	–	–	–
Total	192 667	1941	4071	14372	5421	13596

Çizelge 2.1’de görüldüğü gibi çalışılan türler, tüm deniz türlerinin sadece % 2.1’ini oluşturmaktadır. Bu çalışılan türlerin % 38’ini süngerler, % 20’sini mercanlar, % 14’ünü yumuşakçalar ve % 10’unu derisidikenliler oluşturmaktadır. Yani incelenen türlerin % 82’si

bu dört şubeden oluşmaktadır. Tunikatların da dahil olduğu kordalılar 21 517 türe ev sahipliği yapmasına rağmen, yapılan çalışmalar oldukça azdır.

Son 30 yıldır deniz canlılarından birçok bioaktif bileşik izole edilmiş ve bir kısmı geniş çaplı biyolojik değerlendirme altına alınırken, bazıları da faz denemelerine girmiştir. Çizelge 2.2’de 40 adet biyoaktif bileşik ve kaynakları verilmiştir (10).

Çizelge 2.2 Deniz canlılarından izole edilen bazı bileşikler ve kaynak canlıının şubesi (10)

İsim	Şube
Marinomycins	Aktinobakteri
Saliniketal A/B	Aktinobakteri
Salinosporamide	Aktinobakteri
Thiocoraline	Aktinobakteri
Bryostatin 1	Yosun
Ascididemin	Kordalı
Aplidine	Kordalı
Diazonamide A	Kordalı
Didemnin B	Kordalı
Yondelis	Kordalı
Meridianins	Kordalı
Vitilevuamide	Kordalı
Squalamine	Kordalı
Eleutherobin	Mercan
Pseudopterosin	Mercan
Apratoxin E	Siyanobakteri
Coibamide A	Siyanobakteri
Cryptophycins	Siyanobakteri
Curacin A	Siyanobakteri

Çizelge 2.2. (Devam)

Largazole	Siyanobakteri
Symplostatin 1	Siyanobakteri
Dolastatin 10	Yumuşakça
Indirubins	Yumuşakça
Kahalalide F	Yumuşakça
Prialt	Yumuşakça
Spisulosine	Yumuşakça
Bengamide	Sünger
Dictyodendrin	Sünger
Dictyostatin	Sünger
Discodermolide	Sünger
Dysidiolide	Sünger
Halichondrin B	Sünger
Hemiasterlin	Sünger
Jaspamide	Sünger
Laulimalide	Sünger
Nakijiquinone	Sünger
Peloruside	Sünger
Phorboxazole	Sünger
Salicylhalamide A	Sünger
Variolin	Sünger

2.2. Kordahlılar Şubesi

‘Chordata’ Yunancada ‘ip üzerinde dizili’ anlamına gelmektedir. Bu şubenin üyelerini diğer şubelerden ayıran dört adet tanımlayıcı özellik vardır. Bunlar,

1. Sinir şeridi dorsalde ve içi boş.
2. Vücut, gelişimin bazı safhalarında arkenteronun üstünden oluşan ve hayvanın karın uzunluğu boyunca anteriordan posteriora devam eden sinir şeridinden oluşmuş sert yapı (notokord) ile desteklenir.
3. Fariks çok sayıda silli yarıklardan oluşmuş (stigma) delikli bir yapıdadır.
4. Vücut anüsün arkasından uzayan bir kuyruk ile sonlanır (postanal kuyruk).

Kordalılardan bir alt şubesi olan omurgalılar, içerdiği primatlar, kediler, kuşlar ve diğer iyi bilinen 48 000 türe ek olarak, omurgasız tunikatlılardan ve kafatasızlardan 2200 canlıyı kapsar. Omurgasız kordalılardan hepsi suculdur. Omurgalı akrabaları gibi omurgasız kordalılar da en azından hayatlarının belirli bir safhasında tanımlayıcı özellikleri gösterirler. Tunikatlı altşubesi omurgasız kordalılardan % 90'ını kapsar.

Alt şube Cephalochordata (=Acrania)

Yunancada başı kordalı anlamına gelen cephalochordata için tanımlayıcı özellikler: Notokord, sinir şeridinin arkasından hayvanın anterior ucuna kadar uzar; kısalabildiği gibi yoğun miyozin filamentleri içeren disk serisi ile uzunlamasına biçimlenebilir. Cephalochordatlar küçük (10 cm'den biraz uzun), lateral olarak yassılaştırmış deniz omurgasızlarıdır. 18S rRNA gen dizilerinin karşılaştırılması, omurgalı olmayan akrabalarımız arasında insana en yakın grubun cephalochordatlar olduğunu göstermektedir.

Alt şube Tunikatlar (=Urochordata)

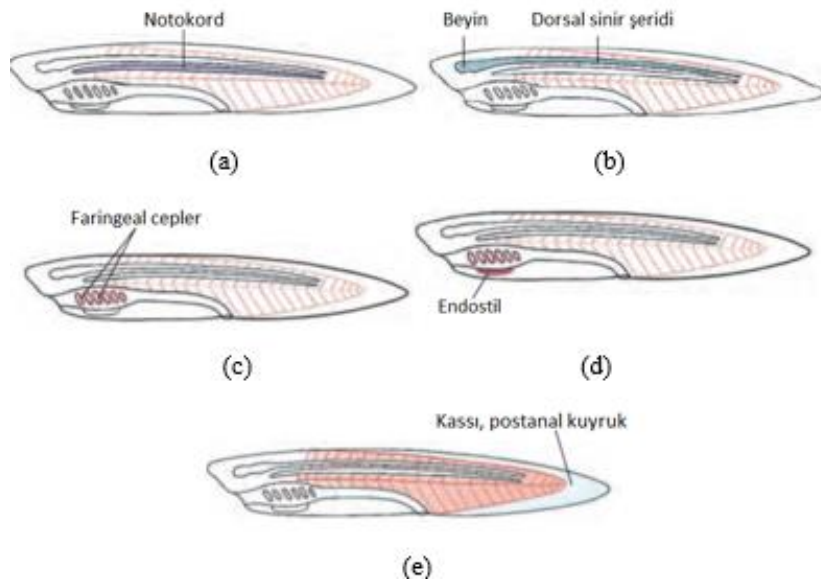
Tunikatlılar için notokord ve sinir şeridi sadece larval safhada bulunması ve metamorfoz sırasında sindirilmesi tanımlayıcı özelliktir. Tunikatlılar, parazitik tür içermeyen nadir taksonomik gruplardandır. Bu altşubenin üyeleri, metamorfozdan sonra iyice belirgin olan görünüşlerinden dolayı 'tunikatlı' olarak anılmışlardır (13).

2.3. Tunikatlıların genel özellikleri

Laticede 'tunic' katlanmış, urochordata ise Yunancada kuyruğu ipli anlamına gelmektedir. Tulumlular, kuyruğu kordalılar daha yaygın olarak tunikatlılar olarak bilinirler. 1600 civarında türü içerirler. Denizin sığ sularından, derin bölgelerine kadar tüm yerlerinde bulunabilirler. Yetişkin halde çoğu sessizdir. Tunikat adını sert ve ölü, hayvanın çevresini saran selüloz yapıdaki 'tunik' den alırlar. Yetişkin halde tunikatlılar hayli özelleşmiş kordalılardır. Birçok tür için, mikroskopik ölçekte görülen larval form kordalılardan beş temel özelliğini taşır. Kordalılardan bu beş temel özelliği: Notokord; dorsal, tübüler sinir şeridi;

faringeal cepler ve yarıklar; endostil; postanal kuyruktur (14). Şekil 2.1 bu özellikleri göstermektedir.

- Notokord, esnek, çubuk benzeri bir yapıdır ve vücut boyunca uzanır. Embryoda oluşan ilk iskeletsel yapıdır. Tunikatlarda, yetişkin metamorfozunda, kuyruk kısmında yer alan notokord kuyrukla beraber kaybolur.
- Dorsal tübüler sinir şeridi, kordalılarda, tekil kord sindirim borusuna dorsaldır ve tübüler şekildedir. Ön kısım genişleyerek omurgalılarda beyni oluşturur. Dorsal sinir şeridi yetişkin metamorfozu ile birlikte tek bir gangliona indirgenir.
- Faringeal yarıklar, faringeal boşluktan dışarıya doğru olan açıklıklardır. Sucul kordalılarda iki cep faringeal yarık oluşturmak üzere faringeal boşluğa doğru kıvrılır. Yırtılmış yutak filtre-beslenme kısmı olarak evrilmiştir. Yemek parçacıklarının asılı olduğu su, ağızdan silya hareketi ile alınır ve faringeal yarık boyunca akarak mukusun yemeği tutmasını sağlar.
- Endostil, Faringeal yüzeyde bulunan endostil, küçük yemek parçacıklarını tutan mukusu salgılar ve faringeal boşluğa getirir.
- Postanal kuyruk, somatik kas yapısı ve sabitleyici notokord ile larval tunikatların ve amfiyoksusun hareketliliğini sağlayan yapıdır. Vücudun son kısmında, boşaltım açıklığının altında bulunan bir yapıdır ve sudaki itici gücü oluşturmayı sağlar (14).



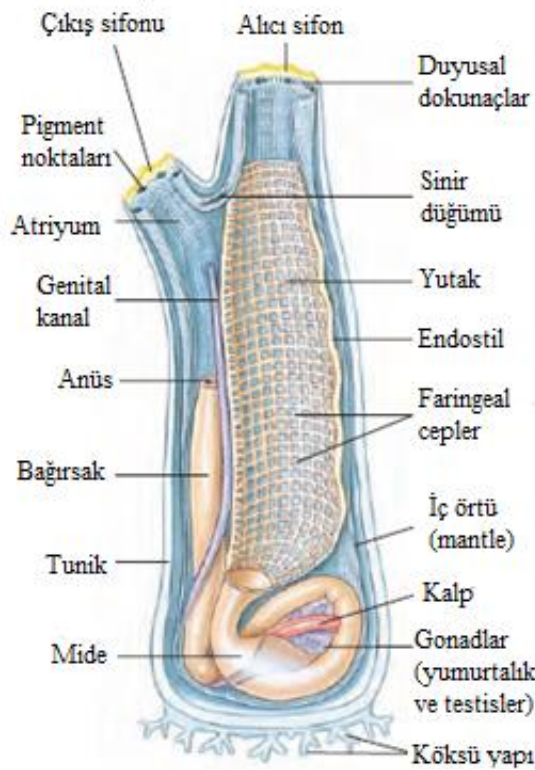
Şekil 2.1. (a) Notokord (b) Dorsal tübüler sinir şeridi (c) Faringeal cepler (d) Endostil (e) Postanal kuyruk (14)

Tulumlular üç sınıfa ayrılırlar:

- Tunikatlar (Ascidiacea)
- Salpalar (Thaliacea)
- Ekliceler (Appendicularia)

Tunikatlar (Ascidiacea) üyeleri en bilindik ve yaygın olarak görülenleridir. ‘Sea squirt’ olarak da anılırlar çünkü rahatsız edildiklerinde çıkış sifonu aracılığıyla su fişkırtırlar. Tüm tunikat türleri sesseldir ve sert bir yüzeye (kaya, gemi batığı vb.) tutunarak yaşarlar. Tekil, kolonize ya da bileşik halde bulunabilirler. Bazı bileşik tunikatlarda her bir üye kendi alıcı sifonuna sahipken, grup tek bir çıkış sifonunu paylaşır.

Tekil tunikatlar (Şekil 2.2) çoğunlukla yuvarlağımsı ya da silindirik yapıdadır. Dışarıdan görülen: Vücudun anterior kısmında oral sifon ve dorsal kısmında bulunan atrial sifon. Tunik soyulduğunda içte bir membran (mantle) bulunur. Su oral sifondan içeri girer ve büyük, kırpıklı yutak içine alınarak yarıklar aracılığıyla düzenli bir sepet örgüsü yapısından perfore edilir. Su atrial boşluğa akar ve atrial sifondan dışarı verilir.



Şekil 2.2 Bir tunikatın genel yapısı (14)

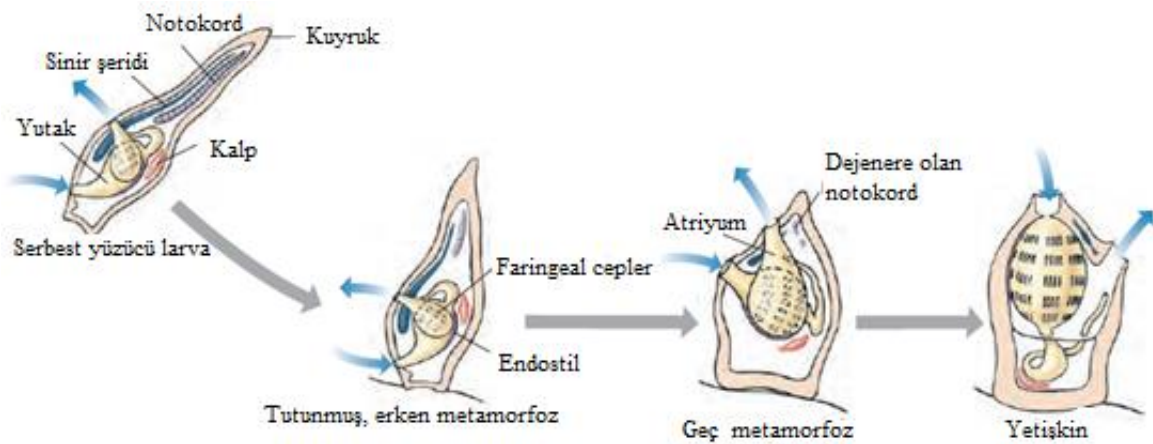
Beslenme, endostil tarafından salınan mukus ağının yapısına bağlıdır. Oral açıklığa getirilen yiyecekler mukus ağına takılır ve siller aracılığıyla özofagus ve mideye taşınır. Besinler midgut tarafından absorbe edilirken, atıklar atrial sifona yakın duran anüsten atılır.

Dolaşım sistemi, ventral bir kalp ve her iki tarafında bulunan büyük kuyudan oluşur. Bu kuyular, daha küçük kuyucukların difüzyon sistemine bağlantılıdır. Diğer hiçbir kordalının sahip olmadığı ilginç bir davranışları vardır: Kalp kanı birkaç kalp atımı boyunca bir yönde pompaladıktan sonra dururak ardından birkaç kalp atımı boyunca tam aksi yöne akıtır. Bir diğer şaşırtıcı özellik ise kanlarında bulunan yüksek miktardaki nadir elementlerdir (vanadyum ve miyobyum gibi). Bir tunikat olan *Ciona*'daki vanadyum konsantrasyonu deniz suyunda bulunandan 2 milyon kat fazladır. Bu nadir elementlerin organizmadaki görevi hala çözülememiştir.

Sinir sistemleri bir sinir ganglionu ile sınırlıdır ve bu sinir ağı yutağın dorsal kısmında uzanır.

Tunikatlar hermofrodittirler. Genelde tek bir hayvanda bir yumurtalık ve bir testis bulunur. Germ hücreleri, kanallar aracılığıyla atrial boşluğa ardından da döllenmenin gerçekleştiği çevreleyen suya taşınır.

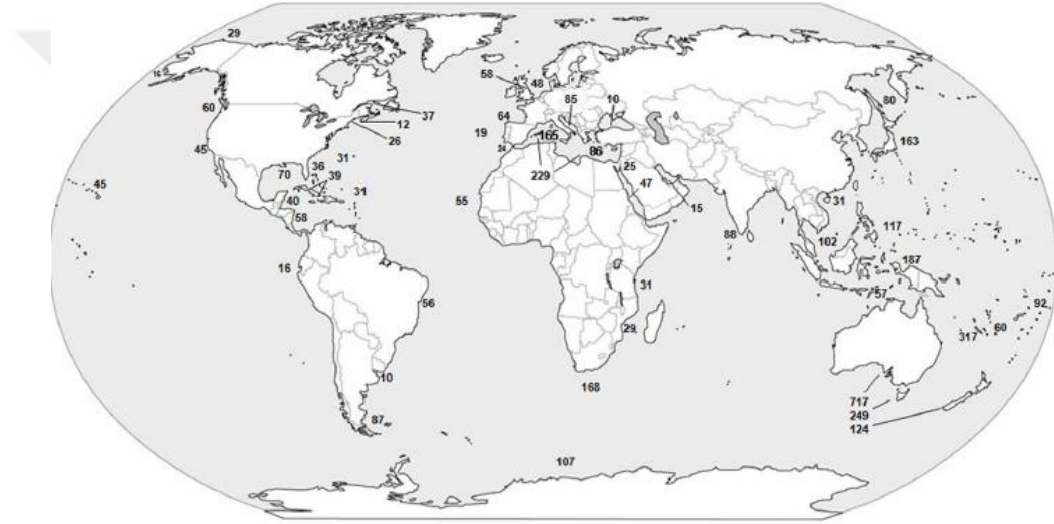
Yetişkin tunikatlar, kordalılarının beş karakteristik özelliğinden ikisini gösterirler: faringeal yarıklar ve endostil. Bununla birlikte larval formları kordalılarla asıl ilişkilerini açığa çıkarır. Larva, kendini dik bir şekilde katı bir yüzeye tutturmadan önce birkaç saat ya da gün boyunca serbest yüzücü larva formunda denizde yüzer. Ardından sessiz bir yetişkin olmak için metamorfoz geçirir ve neredeyse bir kordalı olarak tanınmaz (14).



Şekil 2.3 Larval bir tunikatın yetişkinliğe metamorfozla geçişi (14)

2.4. Tunikatların Dünya'daki ve Türkiye'deki dağılımları

Şekil 2.4'de Dünya'daki değişik bölgelerin tür zenginliği gösterilmiştir. Bu türlerin zenginliğini gösteren bazı bölgelerin listesi Çizelge 2.3'de verilmiştir. En çok tür sayısına sahip bölge Indo-Pasifikte bulunan ve 317 farklı türe ev sahipliği yapan Yeni Kaledonya, 187 türe sahip Batı pasifik okyanusu, 117 ve 102 türe sahip Siam'a ait Guam ve Gulf bölgeleridir. Avustralya ve Yeni Zellanda'da yapılan çalışmalar sonucu 717 tür Avustralya'da, 249 tür Tazmanya'da 124 tür ise Yeni Zellanda'da bulunmuştur. Akdeniz Bölgesi'nde 229 tür vardır. Karadeniz ise 10 farklı türle en az türe ev sahipliği yapan bölgedir (15). Türkiye'de tunikatların dağılımı Çizelge 2.4'de verildiği gibidir.



Şekil 2.4 Tunikatların dünya üzerindeki tür sayısı dağılımları (15)

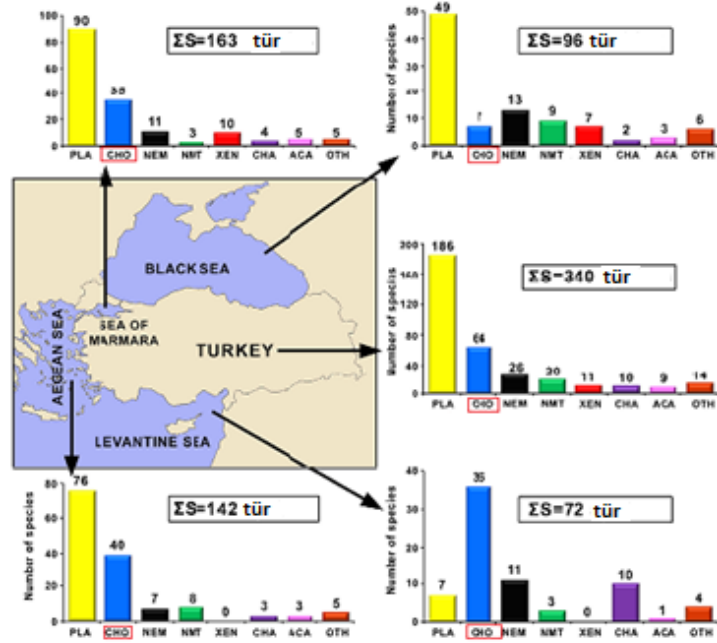
Çizelge 2.3 Tunikatların dünya üzerindeki bazı bölgelerde tür zenginliği (15)

Alan	Tür sayısı
Avustralya	717
Yeni Kaledonya	317
Tazmanya	249
Akdeniz	229
Karadeniz	10

Çizelge 2.4 Tunikatların Türkiye’deki tür dağılımı ve bulunduğu bölgeler (11)

Aile	Lokasyon	Tür sayısı
Asciidiidae	KD, MD, ED, AD	9
Clavelinidae	ED, AD	2
Cionidae	KD, MD, ED, AD	2
Corellidae	MD	1
Diazonidae	MD, ED, AD	2
Didemnidae	MD, ED, AD	3
Molgulidae	KD, MD, ED, AD	6
Polyclinidae	MD, ED, AD	4
Polycitoridae	MD	1
Pycnoclavellidae	MD, ED, AD	3
Pyuridae	MD, EG, AD	9
Styleidae	KD, MD, ED, AD	8

KD: Karadeniz; MD: Marmara Denizi; ED: Ege Denizi; AD: Akdeniz



Şekil 2.5 Kordalılara (CHO) dahil canlıların Türkiye’deki bölgelere göre tür sayısı (11)

2.5. Tunikatların kimyasal içeriği

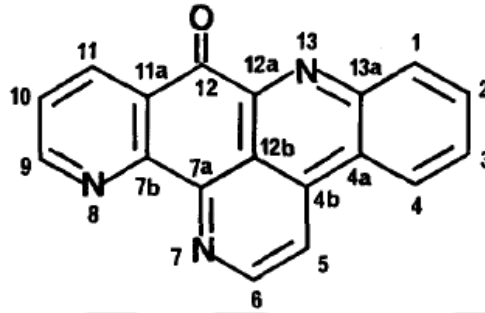
Tunikatlar, kimyasal olarak nitrojen bileşiklerinin ağırlıklı olduğu bir içeriğe sahiptir. Birçok peptit ve depsiyeptit ve bazen de farklı amino asitler içerirler. Heterosiklik alkaloidler bolca bulunur. Non-nitrojen bileşikler olan sekonder metabolitler sayıca daha azdır. Karotenoit, steroid ve terpenoidlerin dışında, makrosiklik laktonlar, polimerler, siklik peroksidazlar ve basit alkil sülfatları da içeren önemli sayıda bileşik tanımlanmıştır (10). Ascidiacea sınıfında sülfür içerikli molekül içeriği oldukça fazladır, bu durum deniz canlıları için alışlagelmişin dışındadır. Tunikatlardan sülfidler/polisülfidler, sülfür heterosiklikler ve alkil sülfatlar izole edilmiştir. Bu bileşiklerden bazıları Ascididae ve Pyuridae ailelerinin tekil tunikatlarında ve Polyclinidae türlerinin kolonilerinde kayda değer ölçüde bulunmaktadır (16). Tunikatlardan izole edilen bileşik türleri şu şekilde sıralanabilir:

- Alkaloidler
 - Piridoakridin polisiklik aromatik alkaloidler
 - Karbolin temelli polisiklik aromatik alkaloidler
 - İndol temelli alkaloidler
 - Tirozin ve fenilalanin türevi alkaloidler
 - Lizin türevi alkaloidler
 - Protoalkaloidler
- Peptidler
 - Tunikrom ve benzeri bileşikler
 - Siklik Peptidler
 - Depsiyeptidler
 - Lineer Peptidler
- Meroterpenoidler
- Diğer nitrojen içermeyen bileşikler
 - Spiroketal içeren ürünler
 - Nitrojen içermeyen fenilalanin ya da tirozin türevli metabolitler
 - Stolonoksidler ve stolonik asitler
- Sülfür-içerikli metabolitler (10)

2.6. Tunikatlardan izole edilmiş bileşikler

2.6.1. Ascididemnin

1988 yılında Okinawa (Kerama Adaları)' dan toplanan *Didemnum* sp. olan bir tunikat ile Japonya' da çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmada türün metanollü ekstresi hazırlanmış ve etil asetat ile su kullanılarak sıvı sıvı ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Etil asetatta çözünen kısım antilösemi aktivite gösterdiğinden, ekstrenin bu kısmını ile çalışmalara devam edilmiş ve sarı bir katı halinde ascididemnin izole edilmiştir. Ascididemnin, pentasiklik aromatik bir alkaloiddir. Molekül formülü $C_{18}H_9ON_3$ olan ascididemninin yapısal formülü Şekil 2.6' da verildiği gibidir.



Şekil 2.6 Ascididemnin' in yapısal formülü (17)

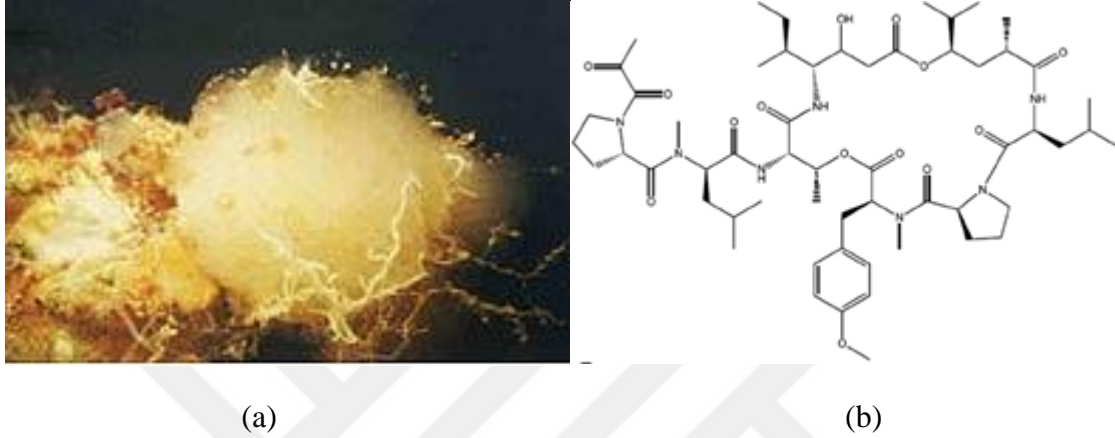
Ascididemninin in vitro olarak L1210 fare lösemi hücrelerine karşı IC_{50} değeri $0.39 \mu\text{g/ml}$ değeri ile sitotoksikite göstermiştir. Ayrıca çok iyi bilinen bir Ca-salıcı olan kafeinden yedi kat fazla Ca-salıcı aktiviteye sahiptir (17).

Daha sonra yapılan çalışmalar da ascididemninin in vivo ve in vitro olarak tümör hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesinin olduğunu göstermiştir. Ascididemnin topoizomeraz II' yi inhibe ettiği ve topoizomeraz II- aracılı DNA ayrılmasını indüklediği görülmüştür (18).

2.6.2. Aplidin (Dehidrodidemnin B)

Didemninler, tunikatlardan izole edilmiş, sitotoksik özellikli, yüksek molekül ağırlıklı makrolit siklopeptitlerdir. Didemnin B, kanser hastalarında klinik I/II çalışmalarına girmiş ilk ascidiacea sitotoksindir. Bununla birlikte, kas ve kalp kaslarında toksisiteye sebep olduğundan, daha iyi teröpatik etki gösteren moleküller türetilme çalışmaları başlamıştır (19). *Aplidium albicans*' dan izole edilen Aplidin, Plitidepsin ve Dehidrodidemnin B olarak

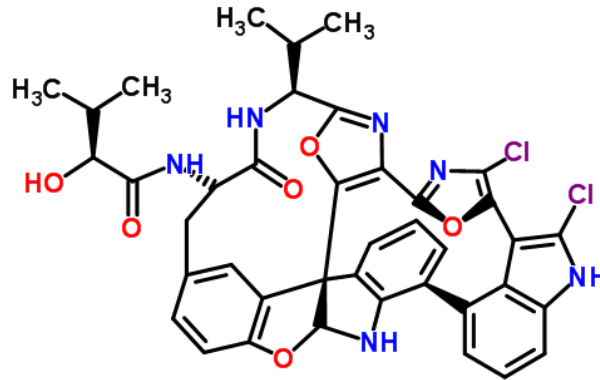
da bilinen ve Didemnin B' ye benzer; ancak yan zincirde bir n- laktid piruvil grup içerir. Bununla birlikte antitümör kapasitesi Didemnin B 'den çok daha fazladır. Didemnin B' ye yapısal benzerliği ve nispeten küçük boyutlu oluşu etkili didemnin analogları üretimini sağlamıştır. Aplidin birçok sitotoksik mekanizmaya sahiptir: Mitokondri ilişkili apoptoz, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salınımının bloke edilmesi, p53- bağımlı apoptoz, hücre döngüsünü G1-G2 de durdurması ve reseptör proteinlerin inhibisyonu (2).



Şekil 2.7 (a) *Aplidium albicans* (19) ve (b) Aplidin kimyasal yapısı (18)

2.6.3. Diazonamit A

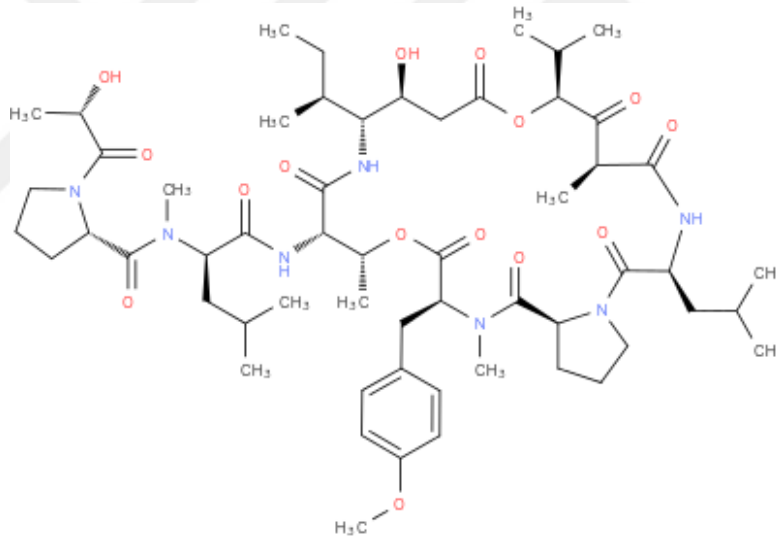
1991 yılında yapılan çalışmada, koloni halinde bulunan bir tunikat türü olan *Diazona chinensis* ile çalışılmıştır. Örnek, Filipinler' de bulunan Siquijor Adaları bölgesinden, küçük mağaraların tavanlarından toplanmıştır. Ekstre hazırlanmış ve hekzan, metanol, bütanol ve su ile sıvı- sıvı ekstraksiyon yapılmıştır. Bütanollü ekstreten Diazonamit A ve Diazonamit B izole edilmiştir. Bileşikler sitotoksik aktivite göstermiştir (20). Şekil 2.8' de Diazonamit A' nın yapısı verilmiştir (21).



Şekil 2.8 Diazonamitin kimyasal yapısı (21)

2.6.4. Didemnin B

Didemnin B ilk olarak 1981’ de *Trididemnum solidum*’ dan izole edilmiş ve antiviral ve sitotoksik özellikler göstermesi ile faz çalışmalarına giren ilk deniz kaynaklı bileşik olmuştur (2). Şekil 2.9’ da Didemnin B’ nin kimyasal yapısı verilmiştir (22). Didemnin B in vitro ve in vivo olarak antitümör biyoaktivite göstermiştir (0.001 µg/ml L1210 lösemi hücrelerinin büyümesine % 50 oranında inhibisyon). Antitümör etkisinin yanı sıra antiviral aktivite de göstermiştir (23). Bileşik protein sentezini ve hücre büyümesini EF-2 bağımlı ribozomal translokasyonu önleyerek engeller ve ayrıca protein kinaz bağımlı apoptozu indükler. Birçok kanser hattına karşı gösterdiği ilk başarılarla Faz I ve Faz II çalışmalarında çalışılmıştır. Bununla birlikte, anafilaksi ve nöromusküler toksiste gibi yan etkiler göstermesi sebebi ile bu klinik çalışmalar 1990’ da askıya alınmıştır. Bu bir hüsrana gibi görülse de antitümör bileşiklerin tunikatlardan elde edilebileceğine dair düşünceleri beslemiştir. Nitekim daha etkili bileşikler, devam eden çalışmalarda izole edilmiştir (2).



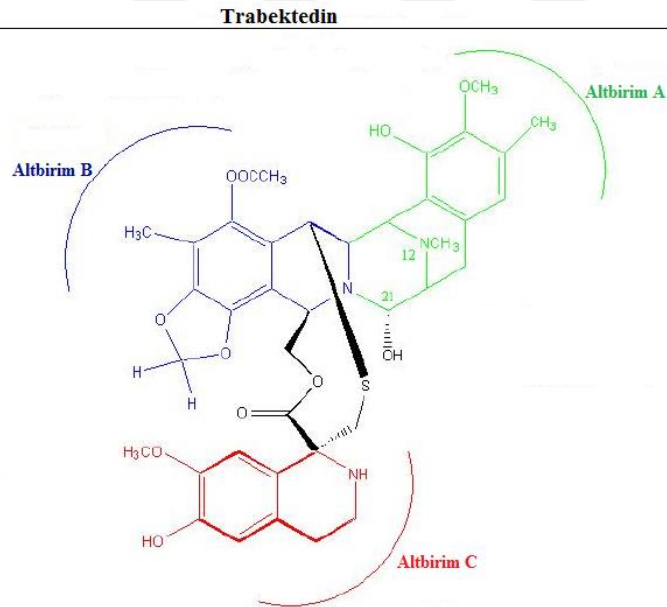
Şekil 2.9 Didemnin B' nin kimyasal yapısı (22)

2.6.5. Ecteinascidin 743 (Trabektedin)

Trabektedinin keşfi ile deniz canlıları muhteşem bir başarı elde etmiştir. Trabektedin (ET-743) *Ecteinascidia turbinata*’ dan izole edilmiş bir bileşiktir. Kimyasal yapısında üç adet birleşik tatrahidroizokinolin halka yapısına sahip bir alkaloiddir. Şekil 2.10’ da trabektedinin kimyasal yapısı görülmektedir (24). Pharma Mar tarafından Yondelis™ adı ile market satışı bulunan tek deniz kaynaklı antitümör ilaçtır. Bununla birlikte çok az miktarda izole edilebilmeleri klinik çalışmalar için yeterli miktara erişilememesine sebep olmuştur. Bu

durumun aşılması için iki yol kullanılmıştır: Trabektedin için artırılan su kültürü yetiştiriciliği ve bileşiği oluşturmak için semi-sentetik yaklaşımlar (2).

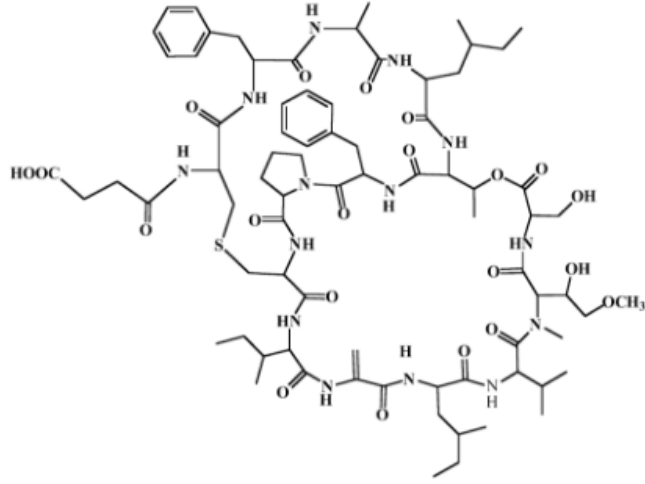
Bileşik yeni bir kimyasal yapıya ve tümör hücre hattına in vitro ve in vivo modellerde oldukça farklı ve etkili bir sitotoksosite gösterdiği için klinik çalışmalara alınmıştır. Trabektedinin etki mekanizması, kanser kemoterapisinde kullanılan diğer DNA-bozucu ajanlardan farklı bir mekanizmaya sahiptir (25). Trabektedinin antitümör aktivitesi sadece tümör hücrelerine etki etmek değil, aynı zamanda tümör mikroçevresine de etki etme yeteneğine de bağlıdır. Bu sebeple trabektedin, kanserin biyolojisini hedef alan anahtar bir bileşik olduğundan oldukça önemli bir antitümör ajandır. Yumuşak doku sarkomasının ve pegile edilmiş liposomal doksorubisin ile birlikte kullanılarak tekrar platin hassas olan yumurtalık kanseri hastaların tedavisinde kullanılmaktadır (26).



Şekil 2.10 Trabektedinin kimyasal yapısı (24)

2.6.6. Vitilevuamit

Vitilevuamit, on üç aminoasitten oluşan bisiklik bir peptittir. *Didemnum cuculiferum* ve *Polysyncranton lithostrotum* olmak üzere iki farklı tunikattan izole edilmiştir (27). Vitilevuamitin yapısı Şekil 2.11’ de verilmiştir. Tübülün polimerizasyonunu inhibe eder. Vitilevuamit, birçok tümör hücre hattının büyümesini G2/M hücre döngüsünde inhibe eder. 12-30 mg/kg dozlarda, 1, 5 ve 9. günlerde lösemi hücresi ekilmiş farelerin ömrünü arttırdığı görülmüştür (28).

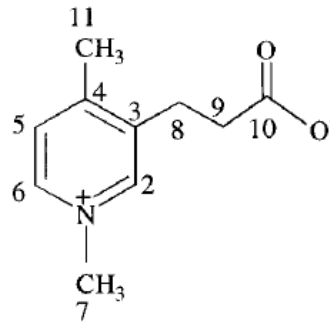


Şekil 2.11 Vitilevuamitin kimyasal yapısı (28)

2.7. *Microcosmus vulgaris*' den izole edilen bileşikler ve biyoaktiviteleri

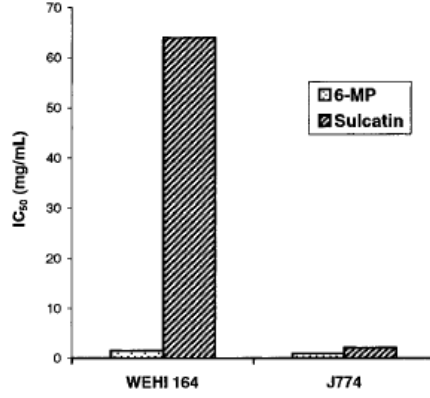
Yapılan literatür taramasında bu türle yapılan izolasyon çalışmalarını içeren dört adet kaynak bulunmuştur. Çalışmalar Anna Aiello ve çalışma arkadaşları tarafından Napoli, İtalya'da gerçekleştirilmiştir.

2000 yılında yapılan çalışmada, in vitro olarak, antiproliferatif etki göstermiş olan yeni bir n- metilpiridinyum alkaloiti izole edilmiştir. Bu amaçla, hayvanın dış çevresini saran tunik ayrılmış ve tüm vücut metanolla (MeOH) (4x300 ml) ile ekstre edilmiştir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonun ardından, n- BuOH fazından çeşitli kromatografik yöntemlerle, sulkatin (Şekil 2.12) saf olarak elde edilmiştir. Sulkatin tunikatlardan izole edilen ilk piridin alkolitidir (29).



Şekil 2.12. Sulkatinin kimyasal formülü (29)

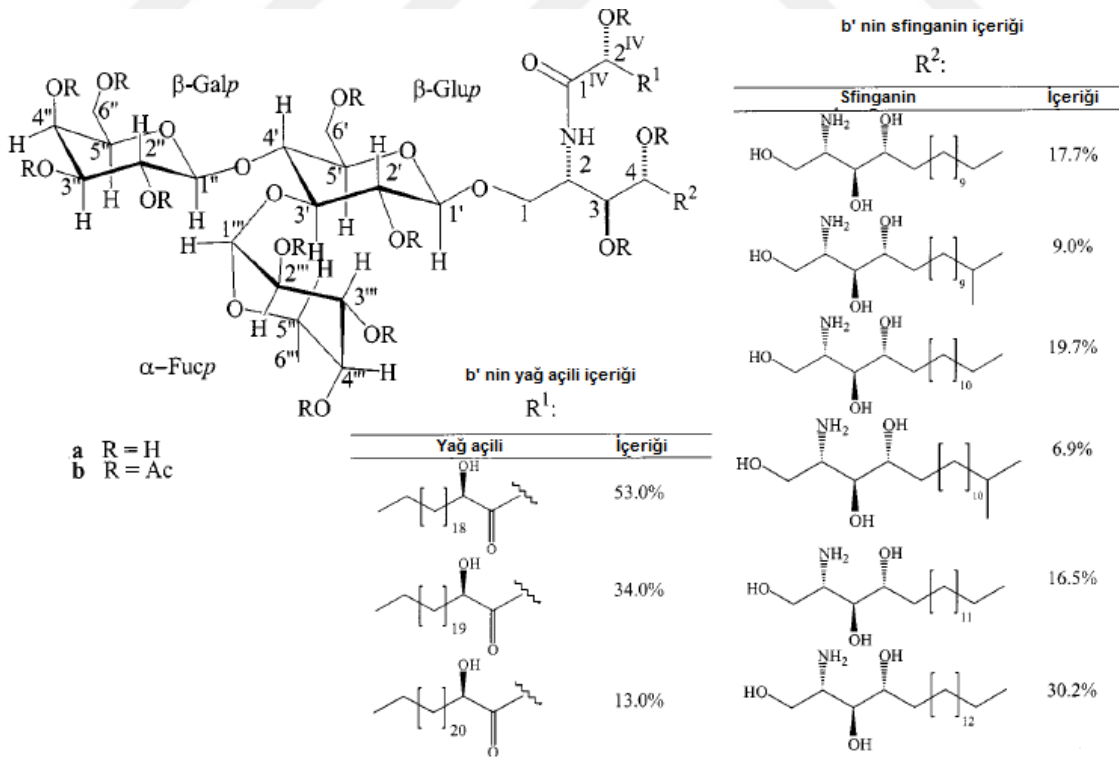
Sulkatinin antiproliferatif etkisi J774 (fare monosit/makrofaj) ve WEHI 164 (fare fibrosarkoma) hücre hatları üzerine in vitro olarak test edilmiştir. Sulkatinin 96 saat sonunda her iki hücre hattındaki büyümeyi inhibe ettiği görülmüştür (Şekil 2.13) (29).



6-MP: Antiproliferatif etki standardı

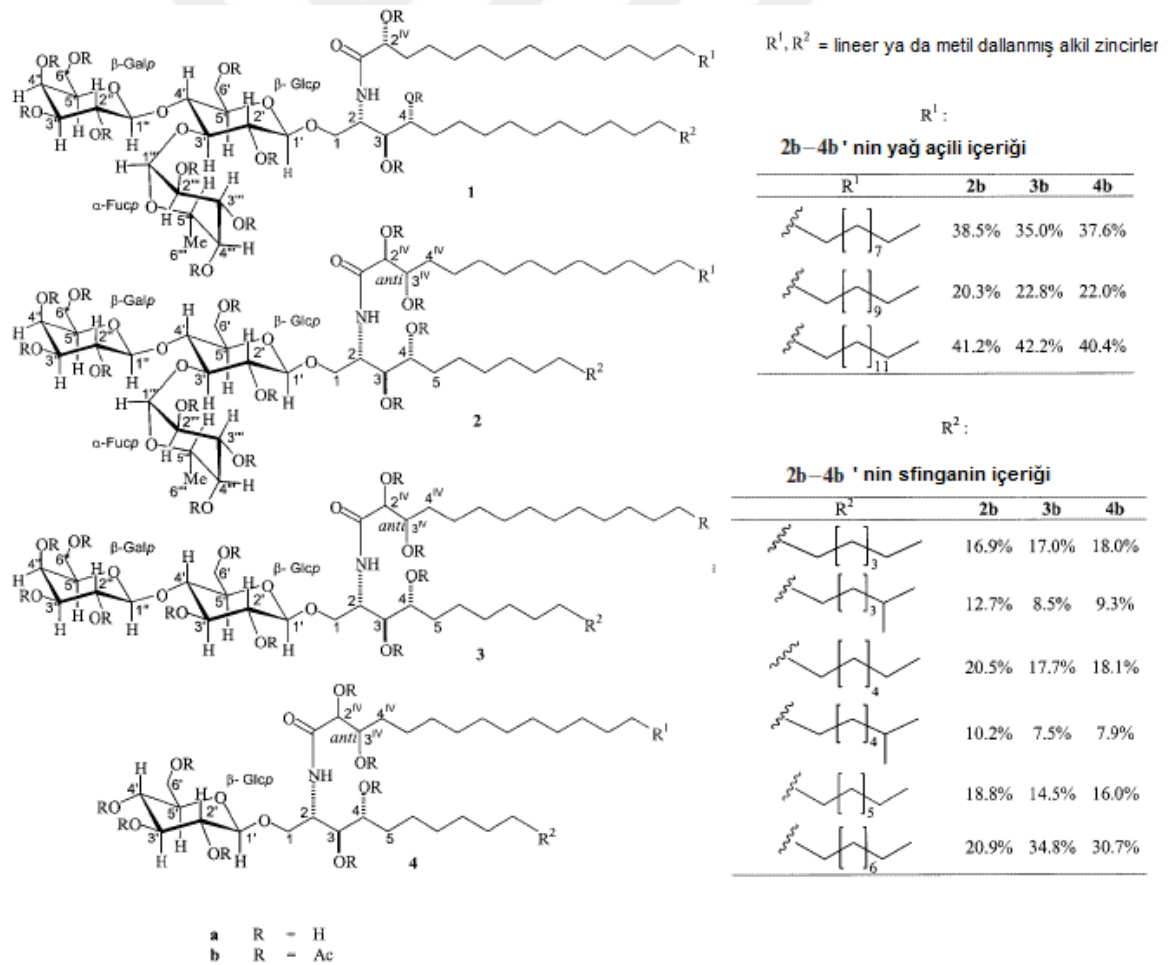
Şekil 2.13 Sulcatinin IC₅₀ (µg/ ml) değeri (29)

2002 yılında gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, yeni bir glikosfingolipit olan sulkakeramit (Şekil 2.14 (a)), perasetat formu (Şekil 2.14 (b)) olarak *Microcosmus sulcatus*'dan izole edilmiştir ve yapısı spektroskopik ve kimyasal analizlerle belirlenmiştir. Bunun için, hayvanın dış çevresini saran tunik ayrılmış ve tüm vücut iki kez MEOH ve iki kez kloroformla (CHCl₃) (4x200 ml) olacak şekilde ekstre edilmiştir. Birleştirilen ekstratlar su ve n- bütanol ile sıvı- sıvı ekstraksiyonu ile edilmiş ve organik faz vakum altında kurutulmuştur. Elde edilen ekstreten çeşitli kromatografik yöntemlerle Şekil 2.14 (b) ' deki sulkaceramit perasetat saf olarak elde edilmiştir (30).



Şekil 2.14 Sulkakeramit (a) ve sulkakeramit perasetatın (b) yapıları ve (b)'nin GC-MS analizi ile elde edilen yağ açılı ve sfinganın içeriklerini gösterir bilgiler (30)

Glikosfingolipitlerin başkalaşım ve/veya büyüme düzenleyicileri olduklarının keşfedilmesinin ardından, deniz omurgasızlarında varoluşu ve kimyasal yapılarının bilgisi biyokimyasal evrim açısından ilgi uyandıran bir konu haline gelmiştir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, her omurgasız deniz canlısının kendine özgü bir glikosfingolipit profiline sahip olduğunu göstermektedir (31). 2003 yılında yapılan çalışmada, üç yeni glikosfingolipit (Şekil 2.15 (2a-4a)), perasetatları (Şekil 2.15 (2b-4b)) olarak *Microcosmus sulcatus*'dan izole edilmiştir ve kimyasal yapıları spektroskopik analizlerle aydınlatılmıştır. 2a- 4a bileşikleri keramitleri 2,3- dihidroksi asit içeren ilk doğal glikosfingolipitlerdir. Ekstraksiyon için, tunik tüm vücuttan ayrılmış ve kalan tüm vücut MeOH ardından CHCl_3 (4x 200 ml) ile ekstre edilmiştir. Bu iki ekstre birleştirilmiş ve ardından su ve n-BuOH ile sıvı sıvı ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Organik faz ayrılmış ve vakum altında organik çözücü uçurulmuştur. Elde edilen ekstreten, Şekil 2.15- 2b, 3b ve 4b 'de verilen bileşikler izole edilmiştir (31).



Şekil 2.15 *Microcosmus sulcatus*'dan izole edilen bileşiklerin yapısı ve ön işlemden geçirilmiş fraksiyonların GC- MS sonuçları (31)

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Doğal kaynaklı etkili maddelere ilginin artması araştırmacıları yeni kaynaklara yönlendirmiştir. Deniz kaynaklı doğal ürünler özellikle ülkemizde yeni ve ilgi çekici bir alandır. Bu amaçla sünger, mercan, tunikat ve algler gibi birçok deniz canlısı ile çalışmalar devam etmektedir. Deniz kaynaklı canlılardan izole edilen ve ilaç haline dönüştürülen Prialt®, Lovaza®/Omacor®, Halaven®, Adcetris®, Carragelose® bunlardan bazılarıdır (1). Yondelis ®'in etken maddesi olan trabektedin kanser tedavisinde kullanılan ve bir tunikat olan *Ecteinascidia turbinata*'dan izole edilmiş bir bileşiktir. Aplidin ve Didemnin B de yine tunikat kaynaklı ve faz çalışmaları devam eden potansiyel birer kanser ilacıdır.

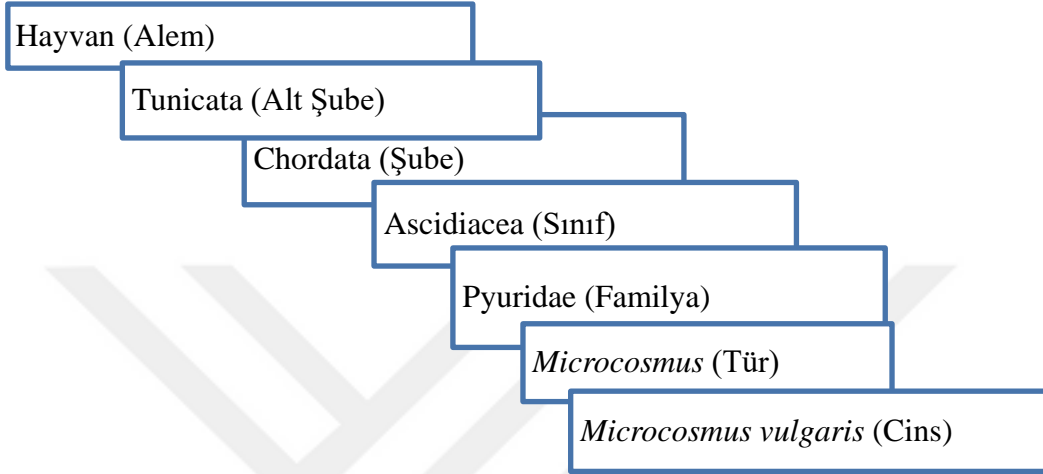
Türkiye'nin üç tarafının denizlerle çevirili olması, tür zenginliği ve bu türlere ulaşmada kolaylık olarak büyük bir avantajdır. Yapılacak bu çalışma, Ascidiacea sınıfına ait bir tunikat olan *Microcosmus vulgaris*' den etkili madde izolasyonu ve biyoaktivite çalışmalarını kapsayacaktır. Bu alanda yapılacak çalışmalar, tunikat kaynaklı biyoaktif doğal ürünlere katkı sağlayacaktır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. *Microcosmus vulgaris*

Microcosmus vulgaris'in sınıflandırması aşağıdaki gibidir.



Araştırma materyali, Mart 2015 tarihinde Ege Bölgesi (İzmir) 'den Dr. Bülent Gözcelioğlu tarafından 40 metreye kadar olan derinliklerden toplanmıştır. % 70'lik etanol içerisinde örnek laboratuvara aktarılmıştır. Tür teşhisinin Dr. Bülent Gözcelioğlu tarafından yapılmasının ardından, ekstraksiyon yapılacak kısım ayrılmış ve numune olarak bir örnek de Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognози A.B.D. araştırma laboratuvarına stoklanmıştır. Şekil 4.1'de hayvanın fotoğrafı ve toplandığı bölge verilmiştir.



Şekil 4.1 (a) Toplanma bölgesi (b) *Microcosmus vulgaris* (40)

4.1.2. Kullanılan kimyasallar ve materyaller

Bu kısımda kullanılan kimyasalları ve ekipmanlar özetlemiştir.

Kimyasallar ve materyaller

- Çözücüler: Metanol, kloroform, hekzan, etil asetat, n- bütanol, diklorometan, distile su, dimetil sülfoksit
YBSK' da kullanılan çözücüler yüksek saflıkta metanol ve nanopure su
- Kolon dolgu malzemeleri: Silika jel 60 (Normal faz) (Merck)
Sefadeks LH- 20 (Sigma Aldrich)
- İnce Tabaka Kromatografisi plağı: Silika jel 60 F₂₅₄ (Merck)
- Anisaldehit reaktifi: 0.1 ml Anisaldehit
2 ml asetik asit
17 ml Metanol
1 ml konsantre sülfürik asit
- Biyoaktivite : Kuyucuklu mikropalakalar
Askorbik asit
Kersetin
Mueller Hinton Besiyeri (MHB, Difco)
Mueller Hinton Agar (MHA, Oxoid)
Sabouraud Dekstroz Agar
Asetilkolinesteraz enzimi
PBS
SDS

Ekipmanlar

- Rotavapor
- Ultrasonik banyo
- UV lambası
- Isıtıcı
- Fraksiyon toplayıcı

- Spektrofotometre
- HPLC
- GC-MS

4.2. YÖNTEM

4.2.1. *Microcosmus vulgaris*' den ekstrenin hazırlanması

İzmir bölgesinden toplanan örnekler, % 70'lik etanol çözücü içerisinde laboratuvara nakledilmiştir. Örnekler küçük parçalara kesilerek, kloroform-metanol 1:1 çözücü sistemi ile ekstre edilmiştir (Şekil 4.2) Ekstraksiyon işlemine renk giderimi sağlanana kadar devam edilmiştir. Ekstre vakum altında rotavapor yardımıyla çözücüsünden kurtarılmış (Şekil 4.3) ve liyofilize edilerek tamamen kuruması sağlanmıştır. Toplam 40 gram ekstre elde edilmiştir.



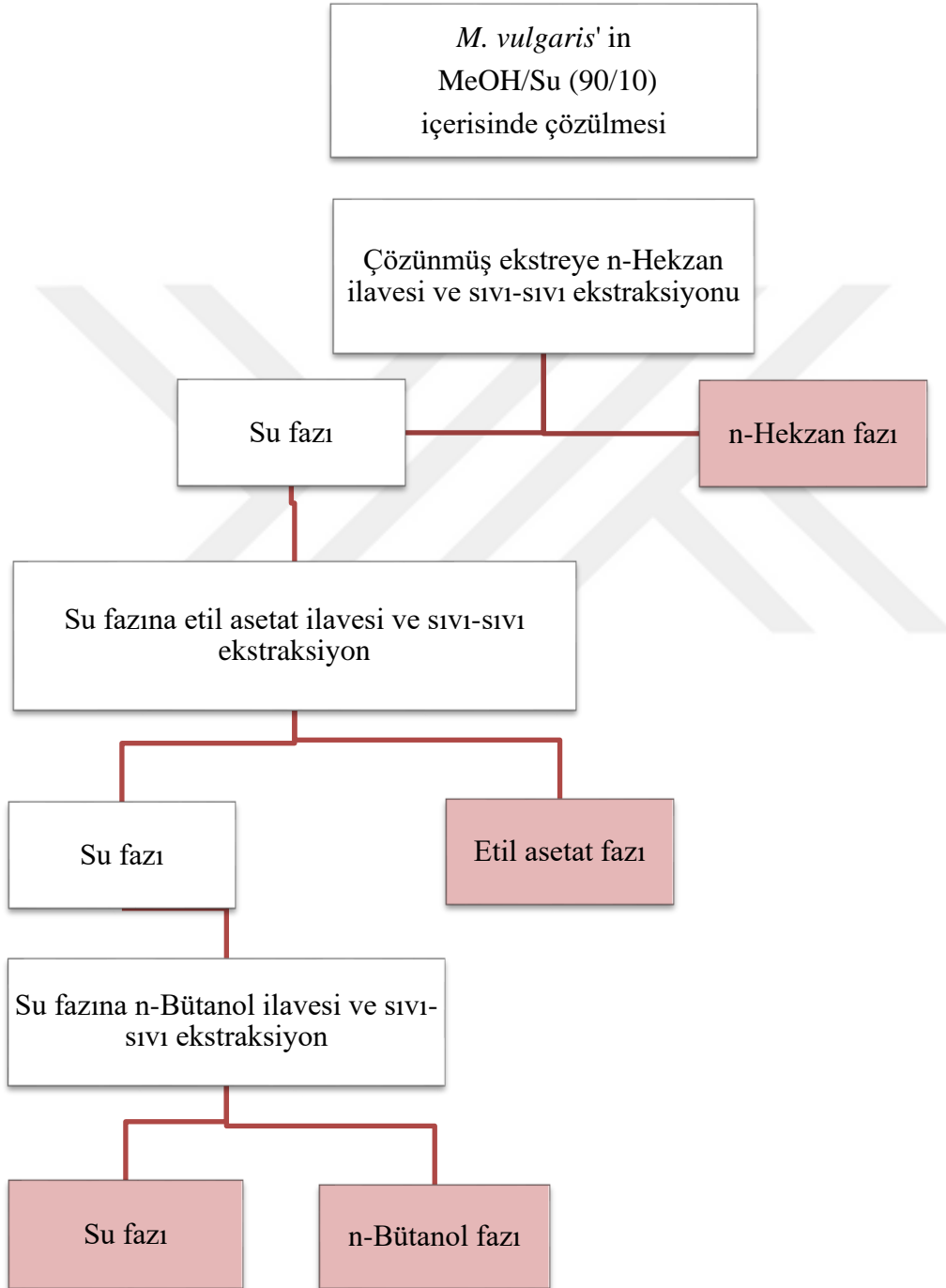
Şekil 4.2 Örneğin kesilmesi ve çözücü içinde bekletilmesi



Şekil 4.3 Çözücünün evaporatör ile uçurulması

4.2.2. Ekstrenin sıvı- sıvı ekstraksiyon ile fraksiyonlanması

Ham ekstrenin 20 gramı metanol-su (90:10) içerisinde çözülerek sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılmıştır. Çözülen bu ekstre Şekil 4.4' deki prosedür takip edilerek fraksiyonlanmıştır. Şekil 4.5' de organik faz ve su fazının ayırma hunisi ile ayrılması gösterilmiştir.



Şekil 4.4 Ekstrenin sıvı- sıvı ekstraksiyon ile fraksiyonlan



Şekil 4.5 Sıvı- sıvı ekstraksiyon ile organik faz ve su fazının ayrılması

4.2.3. Etken maddenin izolasyonu

Bütanol fraksiyonu YBSK ile analiz edilmiştir. Analizde Çizelge 4.1' de verilen çözücü sistemi kullanılmıştır.

Enjeksiyon hacmi : 20 μ l

Akış hızı : 1 ml/ dk

Analiz süresi : 60 dk

Kolon : Teknokroma NUCLEOSIL 100 C18 10 μ m 25x 0.46

Dedektör : UV dedektör

Çizelge 4.1 YBSK analizinde kullanılan çözücü sistemi

Dakika	% MeOH	% H ₂ O
0	10	90
5	10	90
35	100	0
45	100	0
50	10	90
60	10	90

n- Bütanol (BuOH) fraksiyonu vakum sıvı kromatografisine (VSK) uygulanmıştır. Kolon durgun faz olarak silika jel ile doldurulmuş, solvan sistemi ise hekzan-etil asetat ve diklorometan- metanol sistemleri gradylen olarak kullanılmıştır (Şekil 4.6).

VSK kolonun özellikleri	Kolon çapı	6 cm
	Dolgu uzunluğu	10 cm
	Dolgu maddesi	Silika jel 60



Şekil 4.6 Vakum sıvı kromatografi ile fraksiyonlama

Kolondan 12 fraksiyon toplanmış ve her bir fraksiyon rotavapor yardımıyla yoğunlaştırılmıştır. Elde edilen fraksiyonların miktarları ve kullanılan elüsyon sistemi Çizelge 4.2’ de verildiği gibidir.

Çizelge 4.2 VSK’ da kullanılan elüsyon sistemi ve kullanılan toplam miktar

Fraksiyon	Hekzan (%)	Etil asetat (%)	Toplam çözücü miktarı, ml	Fraksiyon miktarı, g
1	100	0	500	-
2	80	20	1000	0.8434
3	60	40	1000	0.0856
4	40	60	700	0.05265
5	20	80	500	0.0227
6	0	100	600	0.02059
	Diklorometan (%)	Metanol (%)		
7	100	0	500	0.0373
8	80	20	1000	0.3934
9	60	40	750	0.5206
10	40	60	500	0.147
11	20	80	500	0.10592
12	0	100	1000	0.46012

VSK’ dan elde edilen 2 no’lu fraksiyon için İTK yapılmıştır. Kullanılan hareketli faz Diklorometan- Metanol (50:1)’dir. Bu İTK sonucu ile bu fraksiyonla çalışmaya devam edilmiştir. VSK- 2 fraksiyonu kolon kromatografisi (Şekil 4.7) ile fraksiyonlanmıştır. Hareketli faz olarak diklorometan- metanol sistemi gradyen olarak uygulanmıştır. Yaklaşık

300 fraksiyon toplanmıştır. Elde edilen bu fraksiyonların İTK'larına bakılarak birleştirilmiştir.

Kolon özellikleri	Kolon çapı	2.5 cm
	Dolgu uzunluğu	20 cm
	Dolgu maddesi	Silika jel 60

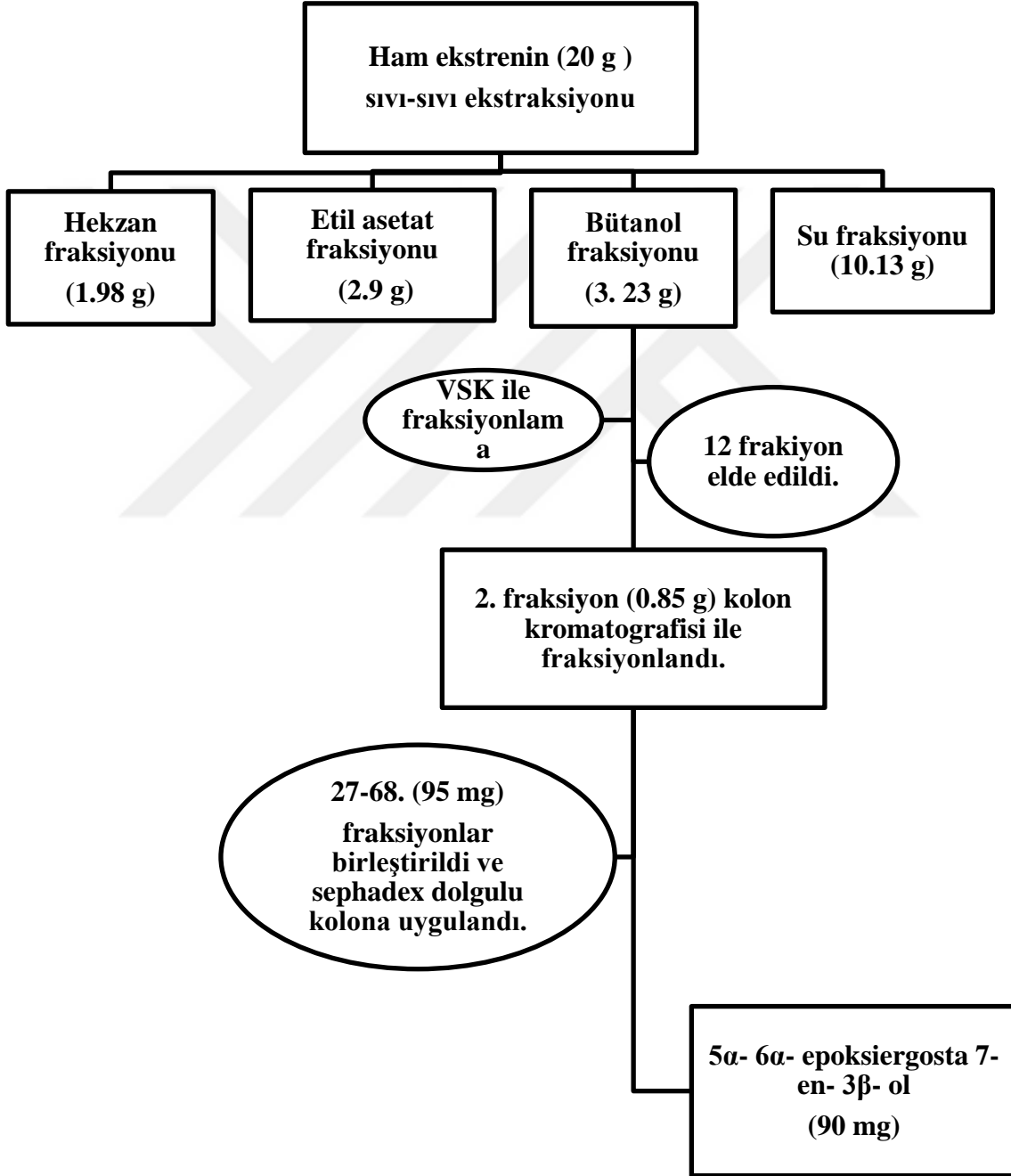


Şekil 4.7 Kolon kromatografisi ile VSK-2'nin fraksiyonlanması

Kolondan gelen ilk fraksiyonlar olan VSK-2.1 ve VSK 2.2 fraksiyonları ile son fraksiyonlardan VSK-301 no' lu fraksiyonlar GC-MS ile analiz edilmiştir. Total metil ester analizinin yapılması için öncelikli olarak lipid ekstresi, Na₂CO₃ ile metanol içerisinde 42°C' de 4 saat boyunca bekletilmiştir. Saponifike edilerek yağ asidi metil esterleri (FAME) elde edilmiştir. FAME karışımı n-hekzan (1 µg/ ml) içinde çözülmüş ve iyon-tuzaklı GC-MS' de % 5 difenil kolon ve EI (70 eV)' de pozitif mod analizör ile analiz edilmiştir. Elüsyon artan bir sıcaklık gradyeniye göre yapılmıştır: 160°C' de 0. dakika, ardından 1. dakikada 5 °C' de 310°C' ye ulaşana kadar sıcaklık artar, 310°C' de ise 20 dakika kalır. 2 µL örnek (1:10) ayrımla ve 3 dakikalık bir boş aralıkla (İç sıcaklık 260°C, transfer hattı 260°C' de ve iyon kaynağı 250°C' dedir) ile enjekte edilir. FAME' ler standart karışımların analizinin ardından retansiyon zamanlarına göre teşhis edilmiştir. Elde edilen GC-MS sonucu sayfa 58'de verilmiştir.

27- 68 no'lu fraksiyonların aynı olduğu görülmüş ve birleştirilmiştir. Fraksiyonun temizlenmesi için Sefadex LH-20 dolgulu kolon kurulmuş ve örnek Diklorometan- Metanol (1:1) içerisinde çözülmüş ve aynı sistemle elüsyon yapılmıştır. Kolondan çok yavaş bir şekilde fraksiyonlar toplanmış ve toplanan örneklerle tekrar İTK yapılmıştır. İTK sonuçları sayfa 48-51'de verilmiştir.

İzole edilen etken madde için izolasyon şeması Şekil 4.8' de verildiği gibidir.



Şekil 4.8 Etken madde izolasyon şeması

4.3. Biyoaktivite çalışmaları

4.3.1. Hep-2 hücrelerinde dizileri üzerinde sitotoksik etki incelemesi

Mossman tarafından geliştirilmiş MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] tayin yöntemi kullanılmıştır. Hücreler (% 10 dana serumu ve % 1 penisilin + streptomisin çözeltisi ihtiva eden DMEM vasatında) 1×10^5 hücre/ml hücre süspansiyonu hazırlanmış ve 100'er µl olarak 96 kuyucuklu plakalara aktarılmıştır. Hücre süspansiyonları; % 5 CO₂, % 95 nem ve 37 °C sıcaklığa sahip inkübatörde 24 saat bekletildikten sonra, kuyucuklardaki vasat aspire edilmiş ve 100'er µl değişik konsantrasyonlardaki ekstre çözeltilerini içeren vasat ilave edilerek 48 saat daha inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda her bir çukurdaki ekstre çözeltileri aspire edilmiş, 100 µl vasat ile çukurlar yıkanarak temizlenmiş ve daha sonra hücrelerin üzerlerine tekrar 100'er µl taze vasat ilave edilmiştir. 5 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde PBS (Fosfat tamponlu salin)'de hazırlanan MTT çözeltisinden herbir kuyucuğa 10'ar µl ilave edilmiş ve 4-6 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sırasında canlı hücrelerdeki dehidrogenaz enzimi MTT'yi mor renkli formazan yapısına indirgemıştır. Süre sonunda çukurlara 100'er µl % 10 SDS (Sodyum dodesil sülfat) çözeltisi ilave edilerek, oluşan formazan kristallerinin çözünmesini sağlamak amacıyla 20 saat daha inkübe edildikten sonra 577/655 nm'de absorbanlar okunmuştur.

4.3.2. Radikal süpürücü etki incelemesi

Deney ortamında, DMSO (Dimetil sülfoksit) tarafından oluşturulan süperoksit radikali, NBT (Nitroblue tetrazolium) ile renkli diformazan bileşiği oluşturur. Deney, antioksidan madde ile teması sonucunda süperoksit radikalinin azalan konsantrasyonunun renkli diformazan bileşiği üzerinden ölçülmesi esasına dayanır. NBT'nin DMSO'daki 1 mg/ml çözeltisinden 0.1 ml, 96 kuyucuklu plakalardaki kuyucuklara aktarıldıktan sonra üzerine ekstrenin DMSO ile çözülerek hazırlanan ekstrenin çözeltilerinden 0.3'er ml ilave edilmiştir. Daha sonra 1 ml alkalın DMSO (0.9 ml DMSO + 0.1 ml 5 mM NaOH) ilavesiyle son hacmin 1.4 ml olmasına dikkat edilerek 560 nm' de absorban ölçülmüştür.

SO radikali süpürücü etki; DMSO, NBT, ve alkalın DMSO içeren çözeltinin (kör) absorbanının, bileşikleri içeren çözeltilerin absorbanlarıyla karşılaştırılması sonucu

tain edilmiştir. Standart olarak, doğal birer antioksidan olan askorbik asit (AA) ve kersetin kullanılmıştır. Standartlar, denenen ekstreler ile aynı şartlarda ve konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

4.3.3. Antimikrobiyal etki

Ekstreden hazırlanan stok çözelti konsantrasyonu $512 \mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüş ve $0.22 \mu\text{m}$ Millipore Membran Filtre (MA 01730, USA) ile sterilize edilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite testler standart ve izole edilmiş suşlara karşı yapılmıştır. Gram-negatif suşlar; *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002, *Acinetobacter septicum* (GATA Microbiology – NRB 239), *Klebsiella pneumoniae* CDC 529, Gram- pozitif suşlar; *Staphylococcus aureus* JCSC 4744, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ve maya türü suşlar; *Candida glabrata* ATCC 90030, *Cryptococcus neoformans* NIH 68 and *Cryptococcus gattii* NIH 112 kullanılarak *M. vulgaris*' in antibakteriyel/ antifungal etkisi tespit edilmiştir.

Mueller Hinton Besiyeri (MHB, Difco) ve Mueller Hinton Agar (MHA, Oxoid) suşların büyümesinde ve bakteri süspansiyonlarının CLSI standartlarında olduğu gibi dilüe edilmesinde kullanılmıştır (32). L- glutaminli RPMI-1640 sentetik besiyeri, pH: 7 olacak şekilde 3-[N-morfolino]-propan sülfonik asit ile tamponlanmış ve kültür süspansiyonları CLSI standartlarına Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) ile hazırlanmıştır (33). İnokülasyonun başlaması için kullanılan bakteri ve mantar süspansiyonları sırasıyla 10^5 cfu mL^{-1} ve $2.5 \times 10^3 \text{ cfu mL}^{-1}$ değerlerinde taze süspansiyonların CLSI standartlarında belirtilen şekilde dilüe edilmesiyle hazırlanmıştır (32,33). Süspansiyon edilmiş bakteri ve mantarlar her bir kuyucuğa dilüe örnekler olarak eklenmiştir.

Antibakteriyel ve antifungal testler için mikrodilüsyon metodu kullanılmıştır (34). $512 \mu\text{g/ml}$ de hazırlanan örnek solüsyonu stok olarak hazırlanmıştır. Mikroplakanın ilk kolonunda bulunan kuyucuğa ve satır boyunca kalan kuyucuklar örneğin dispense edilmesi ile ($256 - 0.5 \mu\text{g/ml}$) kalan kuyucuklar doldurulmuştur. Son satır ise negatif kontrol grubudur. Üstü kapatılan mikroparka nem banyosuna alınmış ve 35°C ' de inkübe

edilmiştir. Bakteriler 24 ve mantarlar için 48 saatlik inkübasyonun ardından gözlem yapılmıştır. Örneğin en düşük konsantrasyonda makroskopik üremeyi inhibe ettiği değer belirlenmiş ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmiştir.

4.3.4. Asetilkolin esteraz inhibisyon aktivitesi

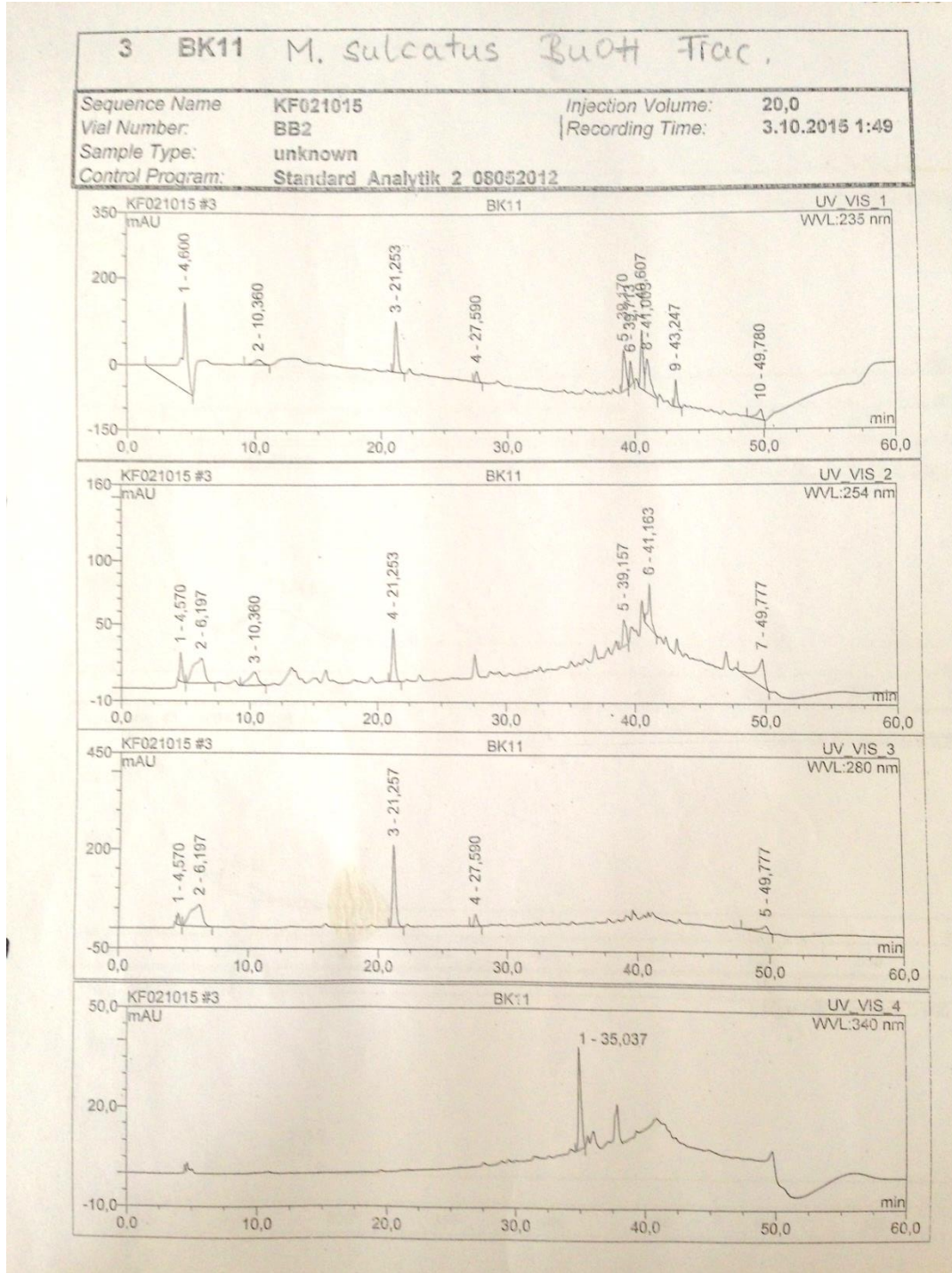
Asetilkolinesteraz (AChE) beyin sinapsları ve nöromusküler bağlantılar için anahtar enzimdir. Bu enzimin temel rolü katyonik nörotransmitter olan asetilkolinin hızlı bir şekilde hidrolize edilmesini sağlayarak impuls aktarımını durdurmasıdır (35). Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde izlenen yollardan biri de asetilkolinesteraz enzimi ile asetilkolin seviyesini kontrol etmektir. Bu sebeple asetilkolin esteraz inhibitörü aktivitesi gösteren maddeler nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılabilir niteliktedir (36).

In vitro asetilkolin esteraz inhibisyon aktivitesi Ellman ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen modifiye mikropilaka deneyi ile yapılmıştır. Temeli nörotransmitter olan asetilkolinin, asetilkolinesteraz (AChE) enzimi ile hidroliz edilmesi sonucu salınan tiyokolin miktarının ölçülmesine dayanan kalorimetrik bir metottur. Tiyokolin salınımı 5,5'-ditiyobis nitrobenzoik asit ile reaksiyon vermesi ile kalorimetrik olarak ölçülür (37). Ekstre 1000 µg/mL konsantrasyonda hazırlanmış ve 25 µL örnek 96 kuyucuklu polistren mikropilaka aktarılmıştır. Metanol (Merck, Almanya) kör olarak ve galantamin (Sigma, ABD) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Tampon B (sığır serumundan albumin, Sigma, ABD)'den 50 µL, kalorimetrik reaktif olan DTNB'den 125 µL ve 25 µL asetilkolin (Sigma, UK) mikropilaka ilave edilmiştir. 405 nm'deki absorbans altyapı olarak ölçülmüştür. Ardından 25 µL AChE (*Electropardus electricus*'dan, tip VI-S, 2000 U/mL, Sigma, ABD) mikropilaka eklenmiş ve okumalar 25 dakikaya boyunca 5 dakikada bir yapılmıştır. Deney üç kez tekrar edilmiş ve inhibisyon ölçülmüştür.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. 5 α - 6 α - epoksiergosta 7-en- 3 β - ol'ün izolasyonu

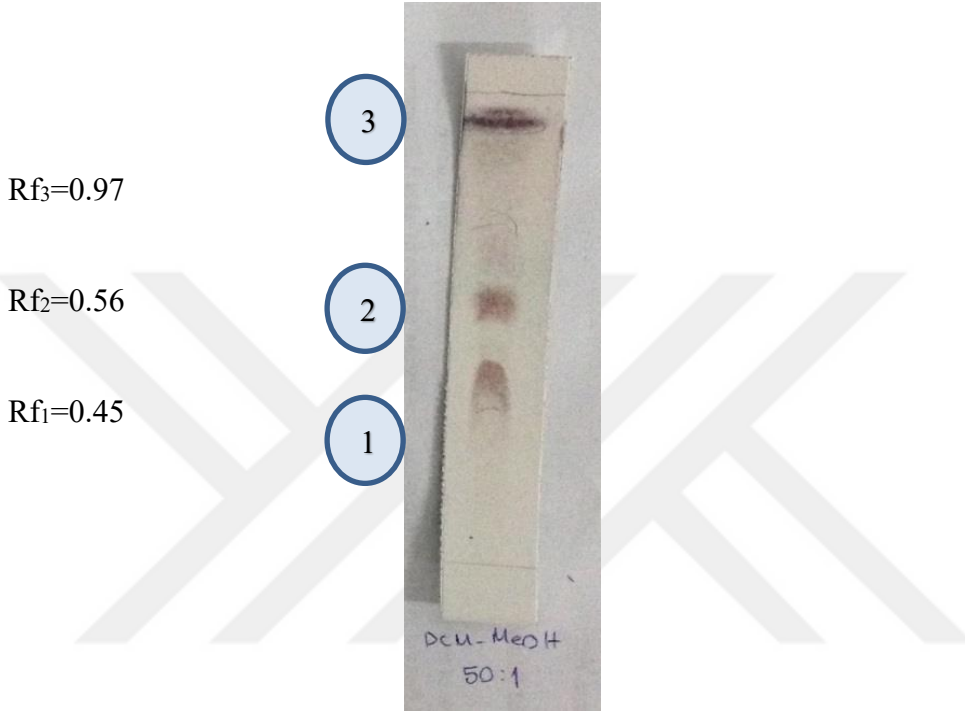
5.1.1. Bütanol fraksiyonun YBSK sonucu



Şekil 5.1 Bütanol fraksiyonu YBSK sonucu

5.1.2. VSK-2'nin ve fraksiyonlarının İTK analizi

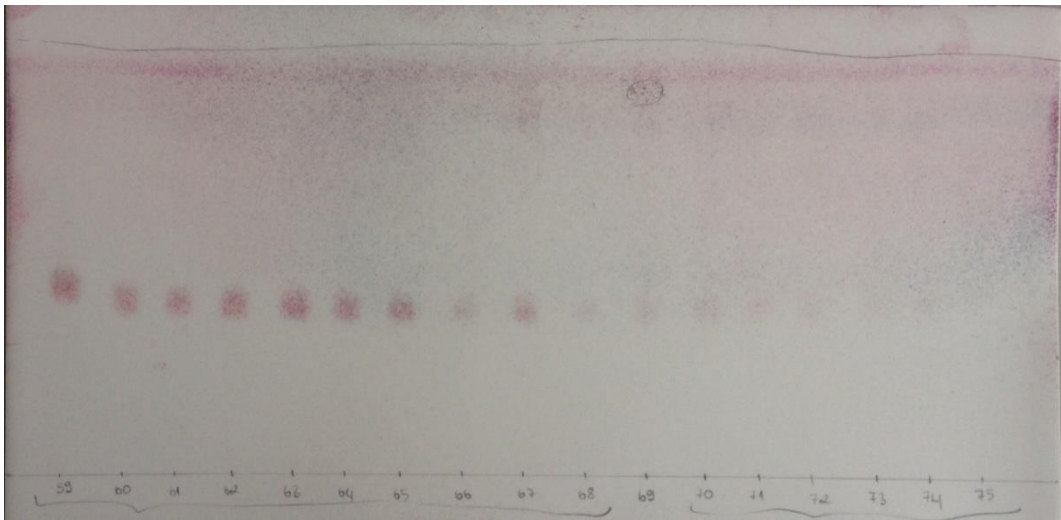
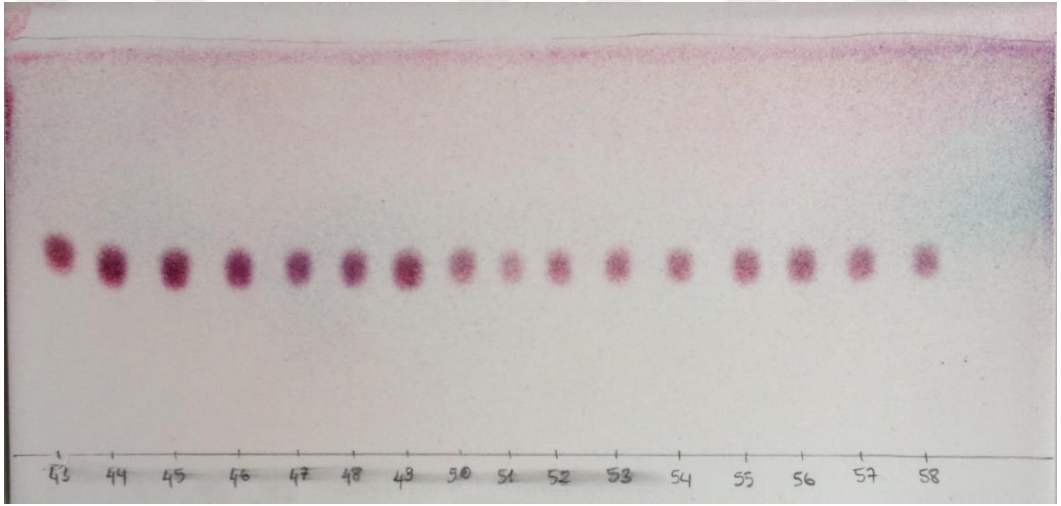
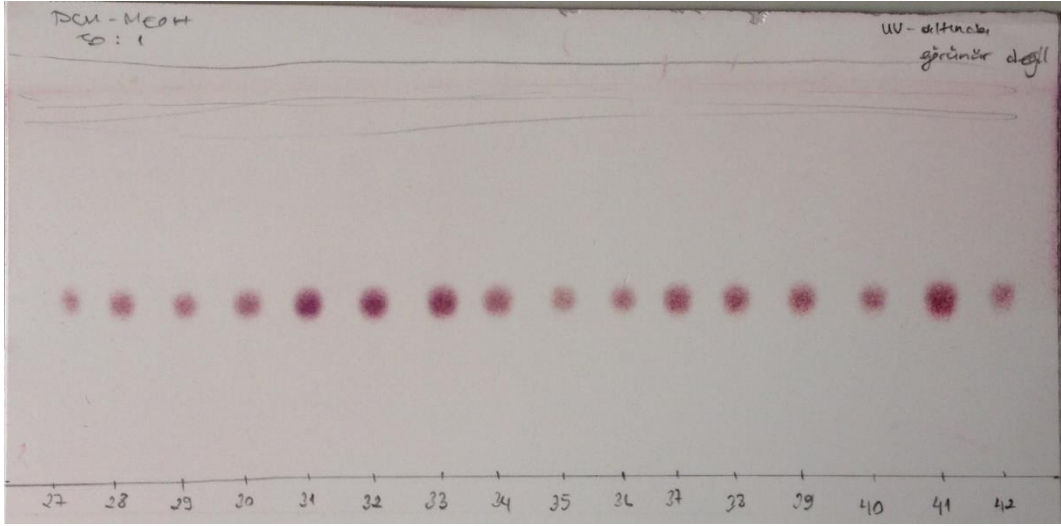
n-BuOH fazının VSK ile fraksiyonlanmasından elde edilen 2. frakyiona (VSK-2) DCM-MeOH (50:1) çözücü sistemi ile İTK yapılmıştır. Beliren noktalar UV 254 ve 366 nm'lerde görülmemiştir. Bu sebeple reaktif olarak anisaldehit reaktifi kullanılmıştır. Bu İTK sonucu Şekil 5.2'de verilmiştir.



Şekil 5.2 BuOH fazından alınan VSK- 2'nin İTK analizi

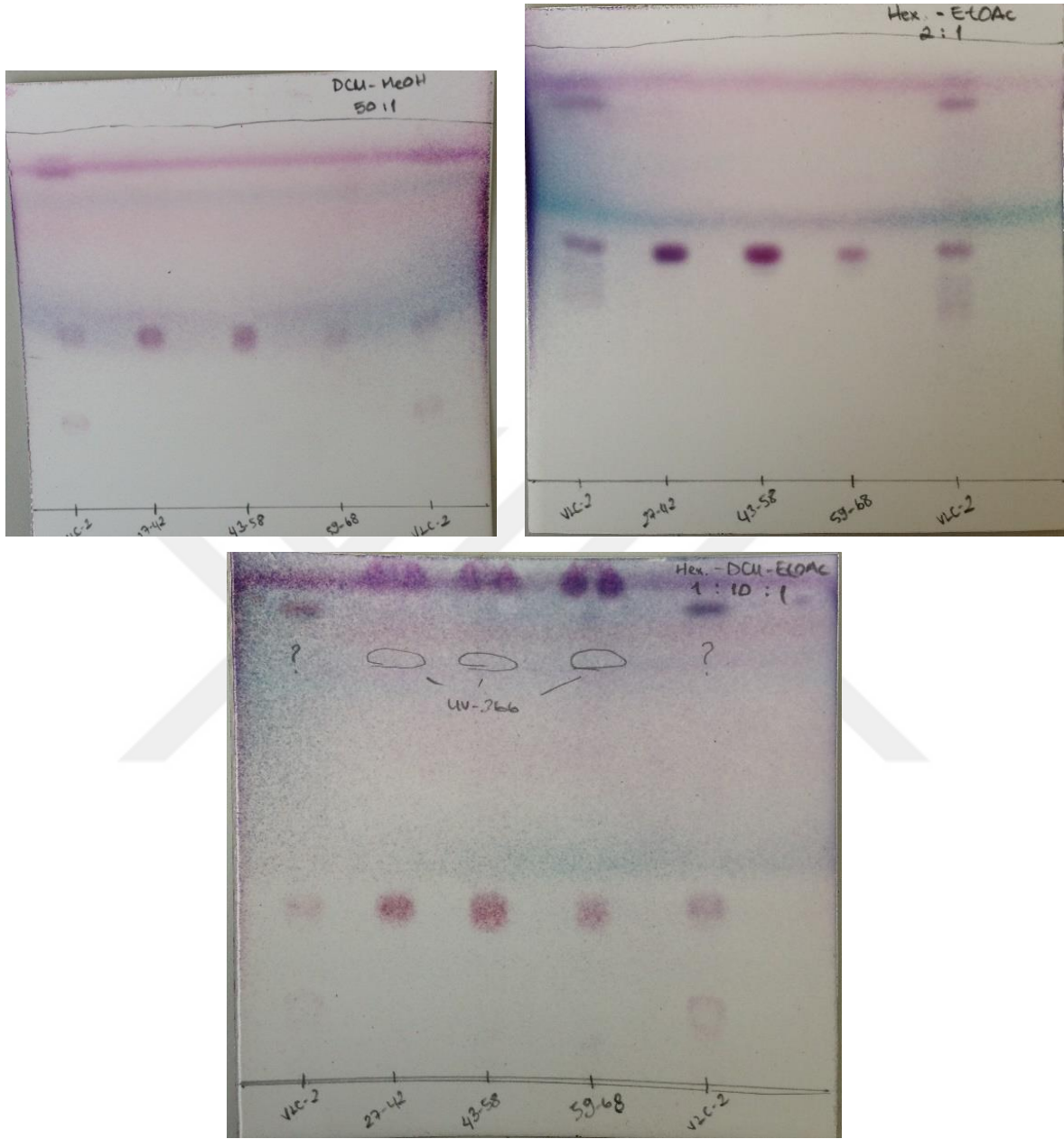
VSK-2 fraksiyonunun silika jel dolgulu kolona uygulanmasının ardından elde edilen, 27-68 no'lu fraksiyonlar (Şekil 5.3) başlangıçtaki çözücü sistemi kullanılarak İTK plağına uygulanmıştır. Elde edilen sonuçta tek bir bant gözlenmiştir ve bu sonuç Şekil 5.4'da verildiği gibidir.

Rf=0.456



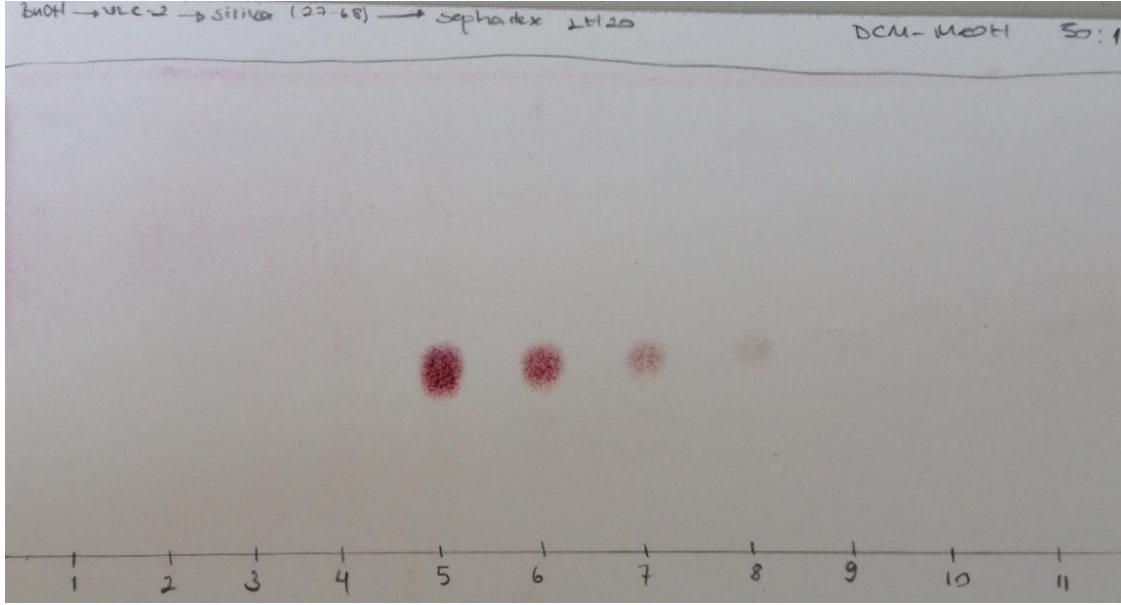
Şekil 5.3 27-68 no'lu fraksiyonların anisaldehit boyaması sonrası görünümü

Bu sonuca bağlı olarak 27-68 no'lu fraksiyonlar birleştirilmiştir. Elde edilen bu fraksiyon farklı çözücü sistemleri ile yürütülmüştür.



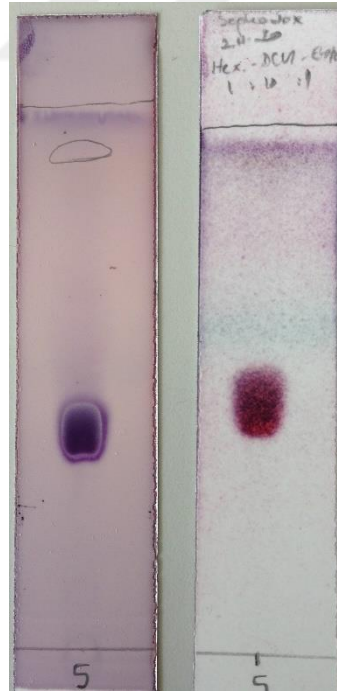
Şekil 5.4 27- 68 no'lu fraksiyonların İTK sonuçları

Görülen safsızlıkların temizlenmesi için 27-68 no'lu fraksiyon (100 mg) sefadeks dolgulu kolona uygulanmıştır. Sefadeks kolondan toplanan fraksiyonlar da aynı çözücü İTK' ya uygulanmıştır. Şekil 5.5' de bu İTK sonuçları verilmiştir.



Şekil 5.5 Sefadex kolondan alınan fraksiyonların İTK sonucu

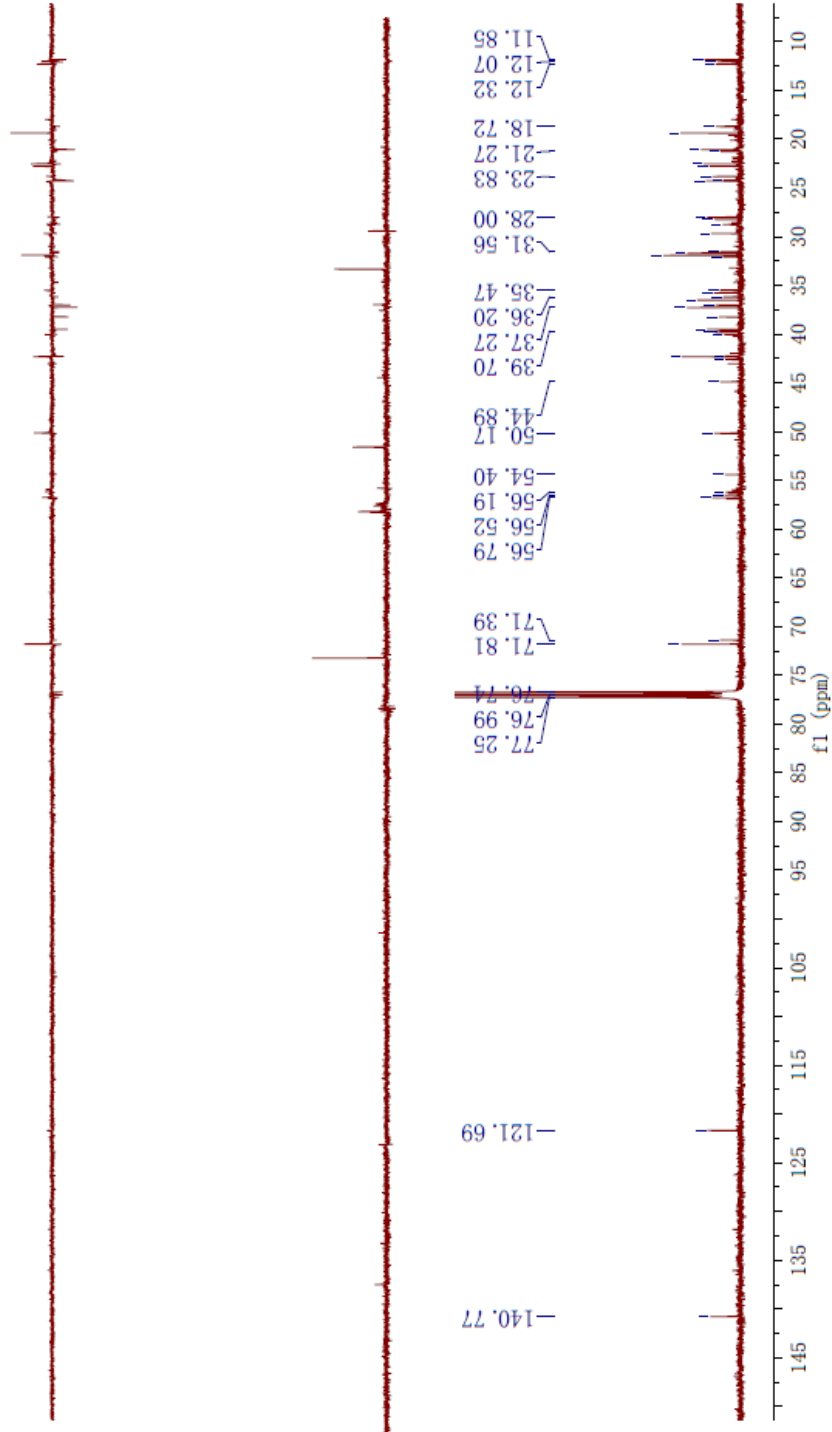
Alınan bu sonuçla 5. Fraksiyon (50.84 mg) bir başka çözücü sistemi ile elüe edilmek üzere İTK' ya uygulanmıştır. Şekil 5.6' da bu İTK' nın sonucu görülmektedir. Solda görülen sonuç anisaldehit reaktifine daldırma yöntemi ile sağdaki sonuç ise reaktifin püskürtülmesi ile elde edilmiştir.



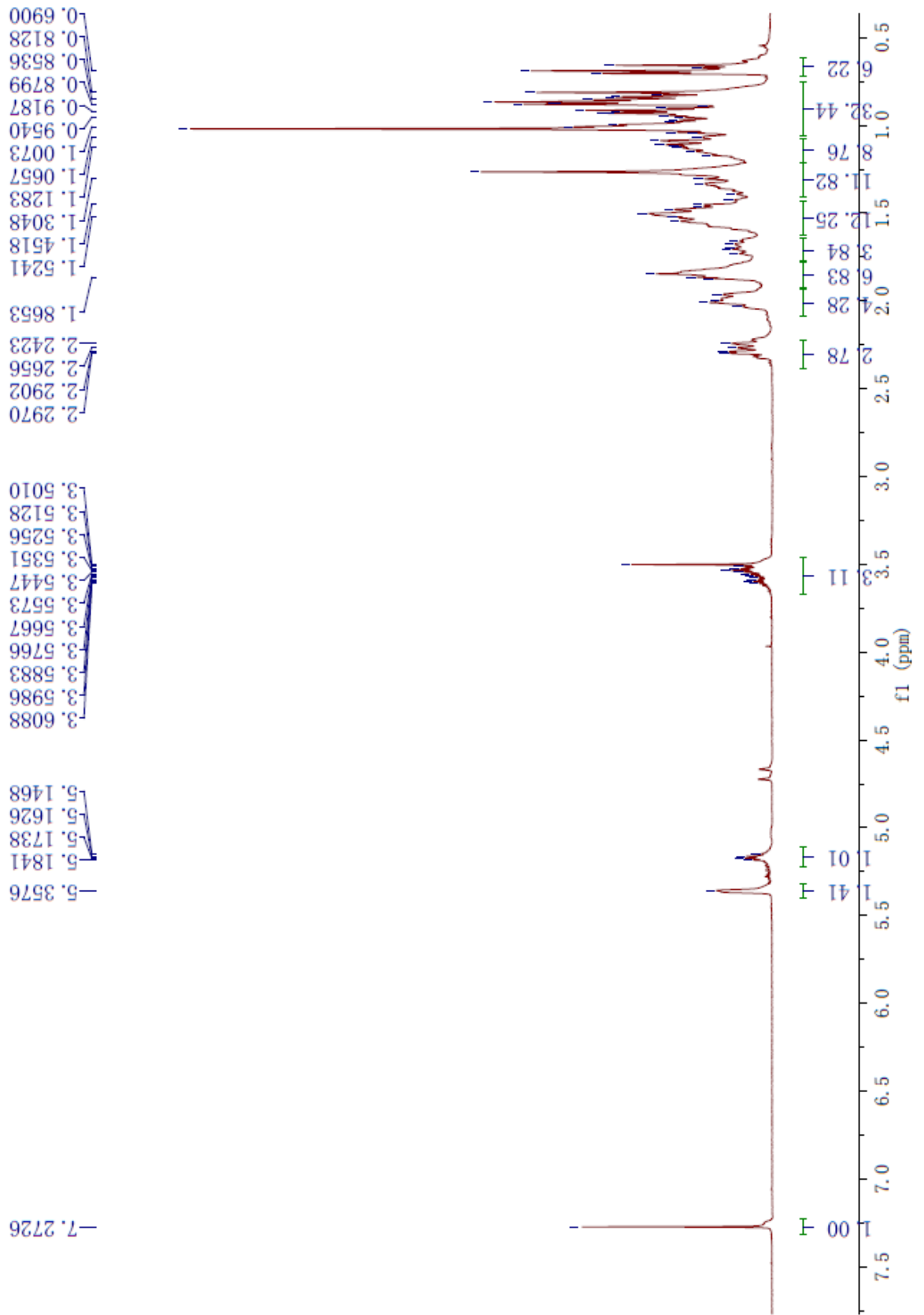
Şekil 5.6 Sefadex kolondan alınan fraksiyonların Hekzan-DCM-EtOAc (1:10:1) yürütülmesi ile elde edilen İTK sonucu

5.1.3. Maddenin NMR analiz sonuçları

Elde edilen bu madde YBSK'da analiz edilmiş ancak herhangi bir pik gözlenmemiştir. Bu aşamadan sonra maddenin Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi ile tayini yapılmıştır. Karbon ve hidrojen NMR sonuçları Şekil 5.7 ve Şekil 5.8'de verilmiştir.

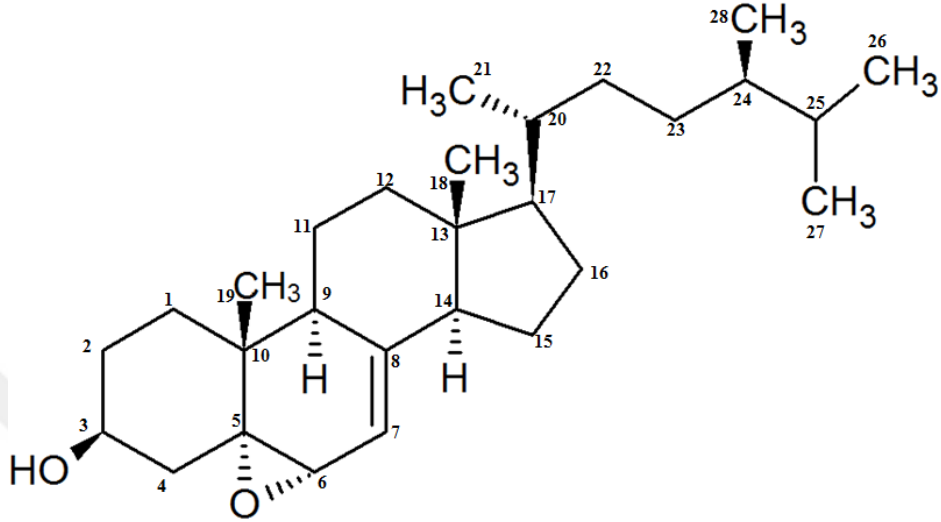


Şekil 5.7 ^{13}C NMR sonucu



Şekil 5.8 ^1H NMR sonucu

Yapılan analiz sonucunda yapının 5 α - 6 α - epoksiergosta 7-en- 3 β - ol olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.9). Literatür taraması yapılmış ve bu sterolün daha önce bir sünger türü olan *Ircinia aruensis* ‘den izole edildiği görülmüştür (38). Örneğin ¹³C ve ¹H NMR data sonuçları Çizelge 5.1’de verildiği gibidir.



Şekil 5.9 5 α - 6 α - epoksiergosta 7-en- 3 β - ol ‘ün yapısı

Çizelge 5.1 Maddenin ¹³C datası

Pozisyon	¹³ C
1	35.47 t
2	30.9 t
3	56.79 d
4	39.52 t
5	71.81 s
6	73.39 d
7	121.69 d
8	140.77 s
9	42.17 d
10	37.27 s

Çizelge 5.1 (Devam)

11	23.83 t
12	39.3 t
13	50.32 s
14	54.40 d
15	22.1 t
16	140.77 s
17	28.0 t
18	56.19 d
19	11.85 q
20	18.9 q
21	36.52 q
22	18.72 q
23	35.78 t
24	30.7 t
25	39.1 d
26	31.56 d
27	20.2 q
28	21.27 q

Çizelge 5.2 Maddenin ¹H datası

Pozisyon	¹ H
H- 1,2,3,4,9,11,12,14,15,16,17	1.30-2.29
M (21-H)	
5	-
6	3.5
M (1-H)	
7	5.14- 5.36
M (1-H)	
8	-
10	-
13	-
18	0.69
M (3-H)	
19, 24	1.00-1.13
M (4-H)	
20	-
21,22,23,26,27,28	0.81-0.95
25	1.58

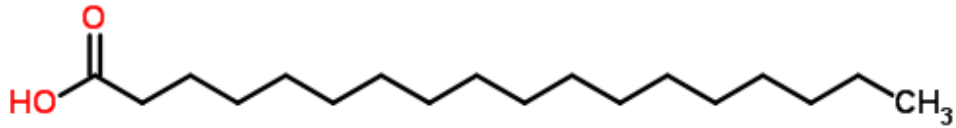
5.2. BUOH VSK- 2.1, 2.1 VE 301 NO' LU FRAKSİYONLARININ GC-MS SONUÇLARI

BuOH VSK- 2.1, 2.1 ve 301 no' lu fraksiyonlarına GC-MS yardımıyla yağ asidi metil ester analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda BuOH VSK-2.1 fraksiyonunda % 50, BuOH VSK-2.2

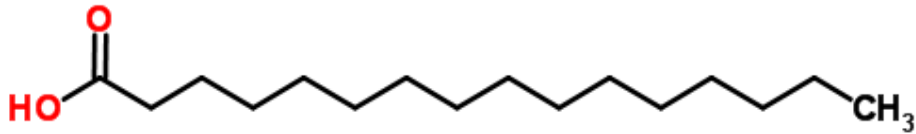
fraksiyonunda % 45 ve BuOH VSK-2.301 fraksiyonunda ise %40 oranında palmitik asit tespit edilmiştir. Her üç fraksiyonda da daha düşük oranlarda stearik asit ve miristik asit ölçülmüştür. Analiz sonuçları Çizelge 5.3’de verilmiştir. Şekil 5.10’ de stearik asitin, Şekil 5.11’ de palmitik asitin, Şekil 5.12’ de miristik asitin yapı formülleri verilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen kromatogram ise Şekil 5.13’da verildiği gibidir.

Çizelge 5.3 GC-MS analiz sonuçları

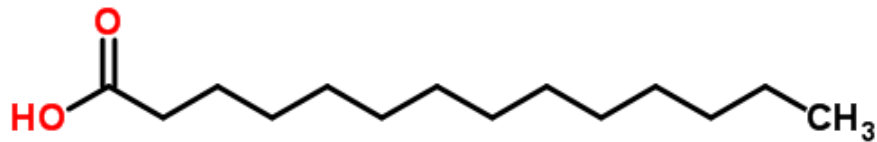
	Stearik asit (C18:0) %	Palmitik asit (C16:0) %	Miristik asit (C14:0) %
BUOH VSK-2.1	9	50	11
BUOH VSK-2.2	12	45	19
BUOH VSK-2.301	8	40	18



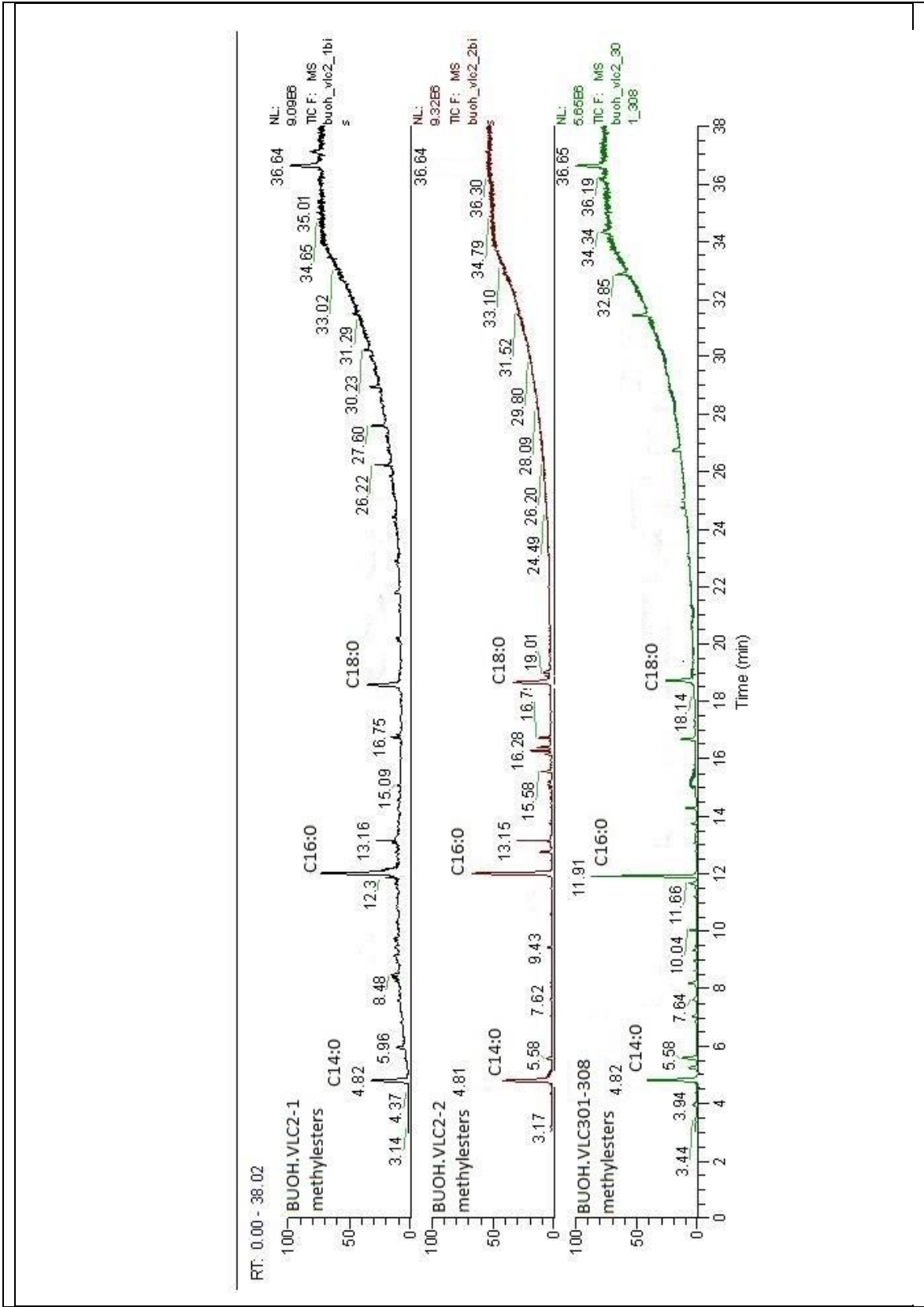
Şekil 5.10 Stearik asitin yapı formülü (37)



Şekil 5.11 Palmitik asit yapı formülü (38)



Şekil 5.12 Miristik asit yapı formülü (39)

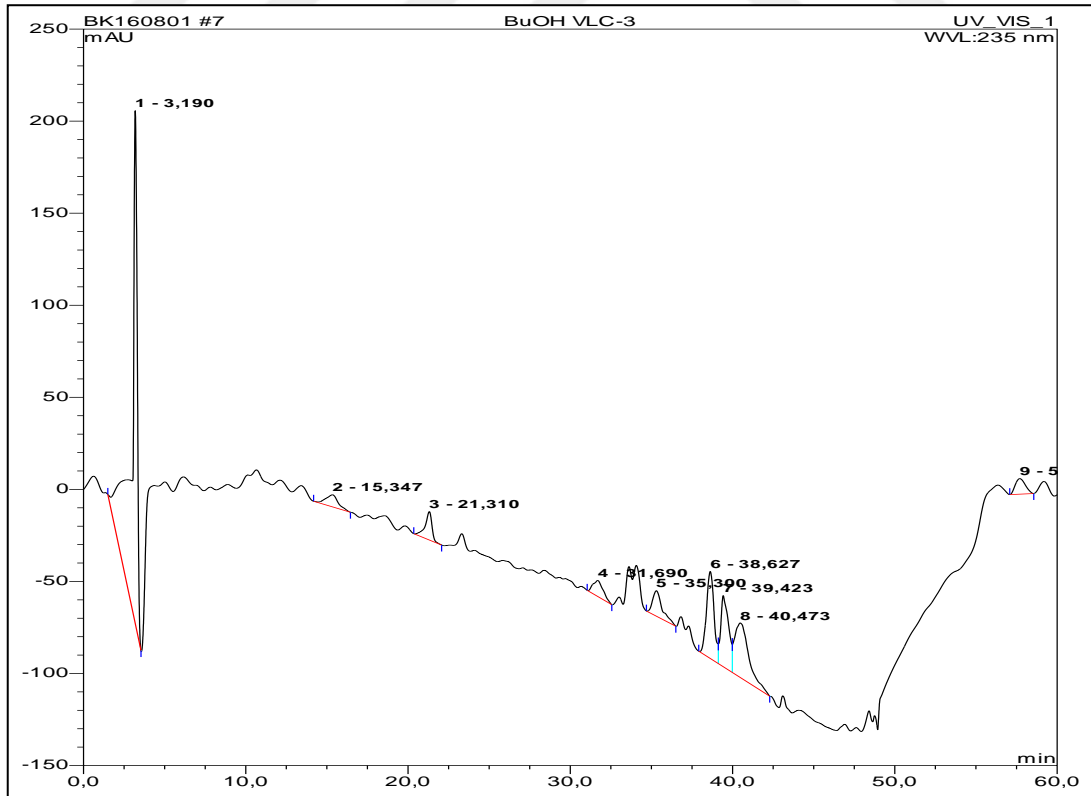


Şekil 5.13 BuOH VSK- 2.1, 2.1 ve 301 no' lu fraksiyonların GC-MS sonuçları

5.3. BUOH VSK-3 FRAKSİYONU YBSK SONUCU VE OLASI MOLEKÜLLER

BuOH VSK-3 fraksiyonuna Düsseldorf Heinrich Heine Üniversitesi'nde yapılan YBSK analizi sonucunda, YBSK'ya ait kütüphane karşılaştırmaları sonucu elde edilen kromatogram Şekil 5.14'de verilmiştir. Piklerin olası yapıları sırası ile aşağıda listelenmiştir:

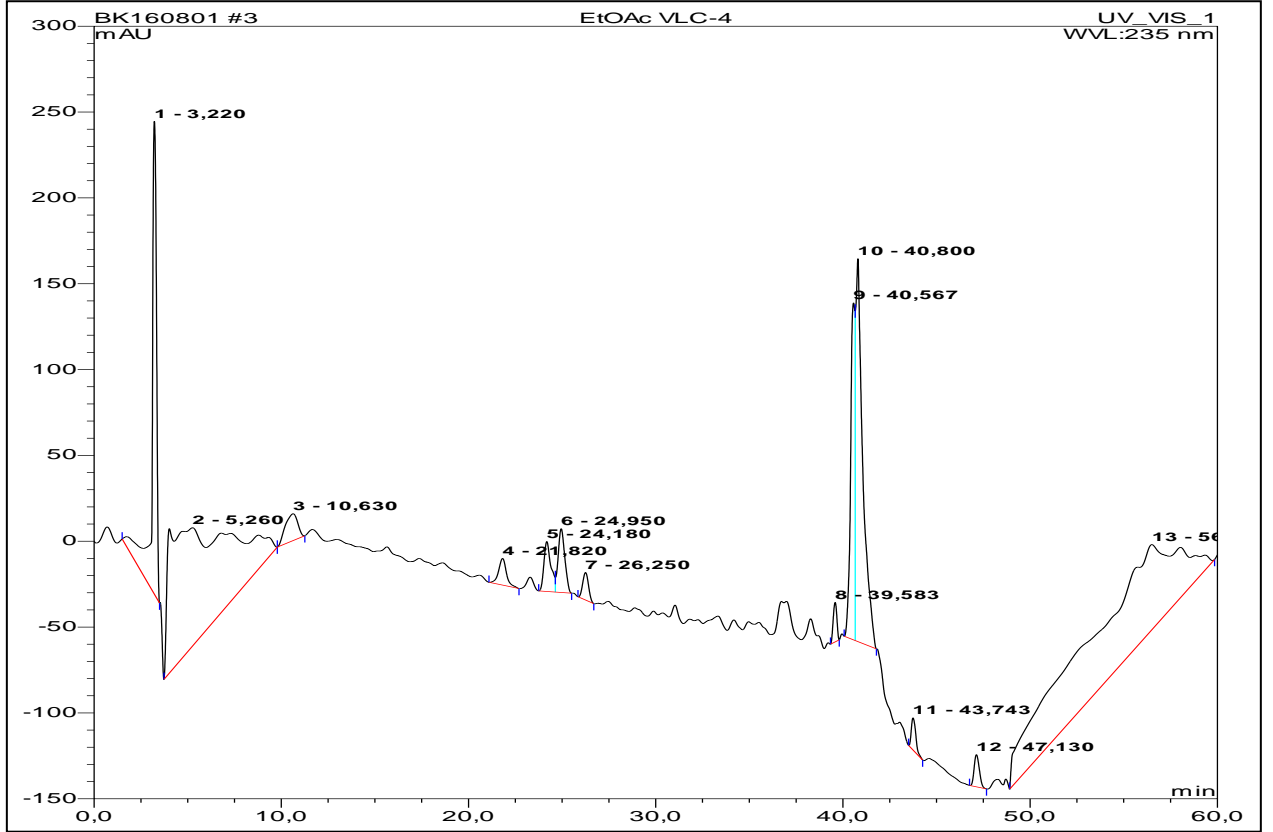
- İlk 2 molekül cihazlarda var olan kirlilikler
- Pik 3: 9 alfa-OH-pinoresinol (Bir bilgi yok)
- Pik 4: Hamigeramide (Daha önce bir sünger türü olan *Hamigera hamigera* ' dan izole edilmiştir (39))
- Pik 5, 6 ve 8: Cihaz kütüphanesinde tanımlı değildir (UV değerleri göz önüne alındığında bu pikler içi şunlar söylenebilir: Pik 5: Peptit türevi olabilir, ancak yapının aydınlatılması gereklidir. Pik 6: Benzen ve bir karbonil grubu içerdiği söylenebilir. Pik 8 ise terpen türevi olabilir.)
- Pik 7: Helenalin' e benzer bir yapı göstermiştir. Bu bileşik daha önce bir bitki türü olan *Helenium autumnale*' den izole edilmiştir.
- Pik 8: Cihaz kütüphanesinde tanımlı değildir (Ama peptid türevi olabilir).



Şekil 5.14 BuOH VSK-3 YBSK sonucu

5.4. ETİL ASETAT VSK-4 FRAKSİYONU YBSK SONUCU VE OLASI MOLEKÜLLER

EtOAc VSK-4 fraksiyonuna Düsseldorf Heinrich Heine Üniversitesi'nde yapılan YBSK analizi sonucunda, YBSK'ya ait kütüphane karışım halindeki maddeler için Pyrenocine A atamıştır. Bu moleküller Pyrenocine A veya türevleri olabilir.

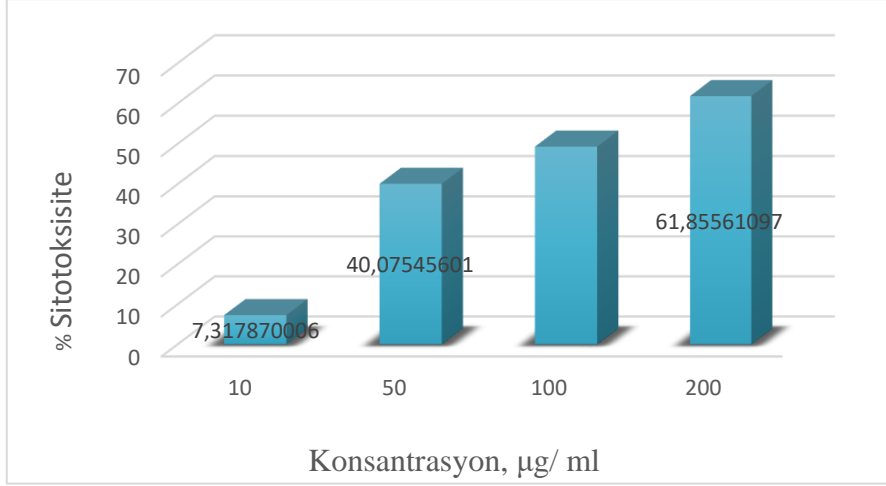


Şekil 5.15 EtOAc VSK-3 YBSK sonucu

5.5. BİYOAKTİVİTE SONUÇLARI

5.5.1. Sitotoksik aktivite deney sonucu

Şekil 5.16'da ham ekstreye ait sitotoksik aktivite deney sonucu görülmektedir. Bu sonuca göre ekstre sitotoksik aktivite göstermiştir ve IC_{50} değeri $40.0754 \mu\text{g/ml}$ ' dir.

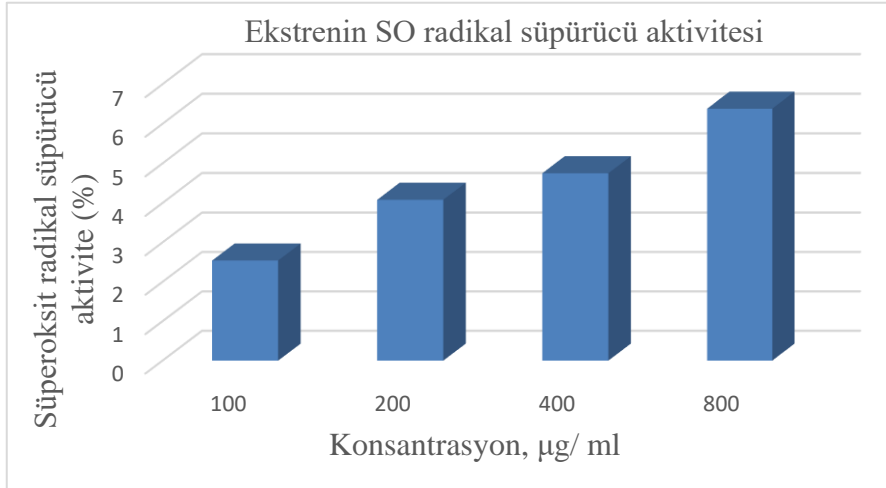


Şekil 5.16 Sitotoksik aktivite deney sonucu

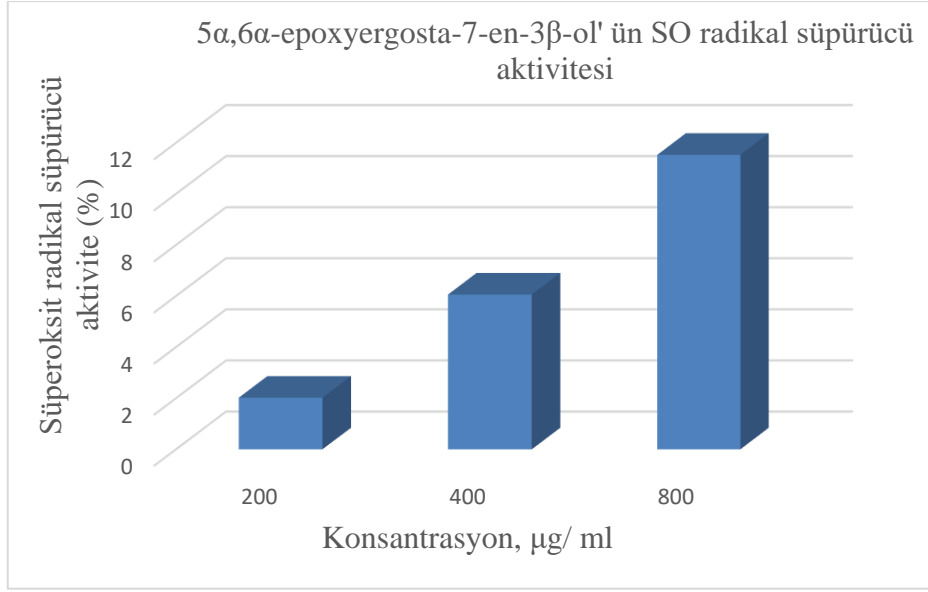
5.5.2. Süperoksit radikal süpürücü aktivite deney sonucu

Şekil 5.17’de süperoksit radikal süpürücü aktivite deney sonucu gösterilmiştir. Ham ekstrenin 800 µg/ ml konsantrasyonda % 10’un altında bir aktivite göstermiştir. Bu sebeple SO radikal süpürücü etkisi yok denecek kadar azdır.

Şekil 5.18’de ise izole edilen 5 α - 6 α - epoxyergosta 7-en- 3 β - ol ile yapılan SO süpürücü aktivite sonucu görülmektedir. Bileşiğin aktivitesi, ham ekstreninkinden daha fazla olsa da dikkate değer bir aktivite değeri okunmamıştır.



Şekil 5.17 Süperoksit radikal süpürücü aktivite sonucu



Şekil 5.18 5 α - 6 α - epoxyergosta 7-en- 3 β - ol' ün süperoksit radikali süpürücü aktivite sonucu

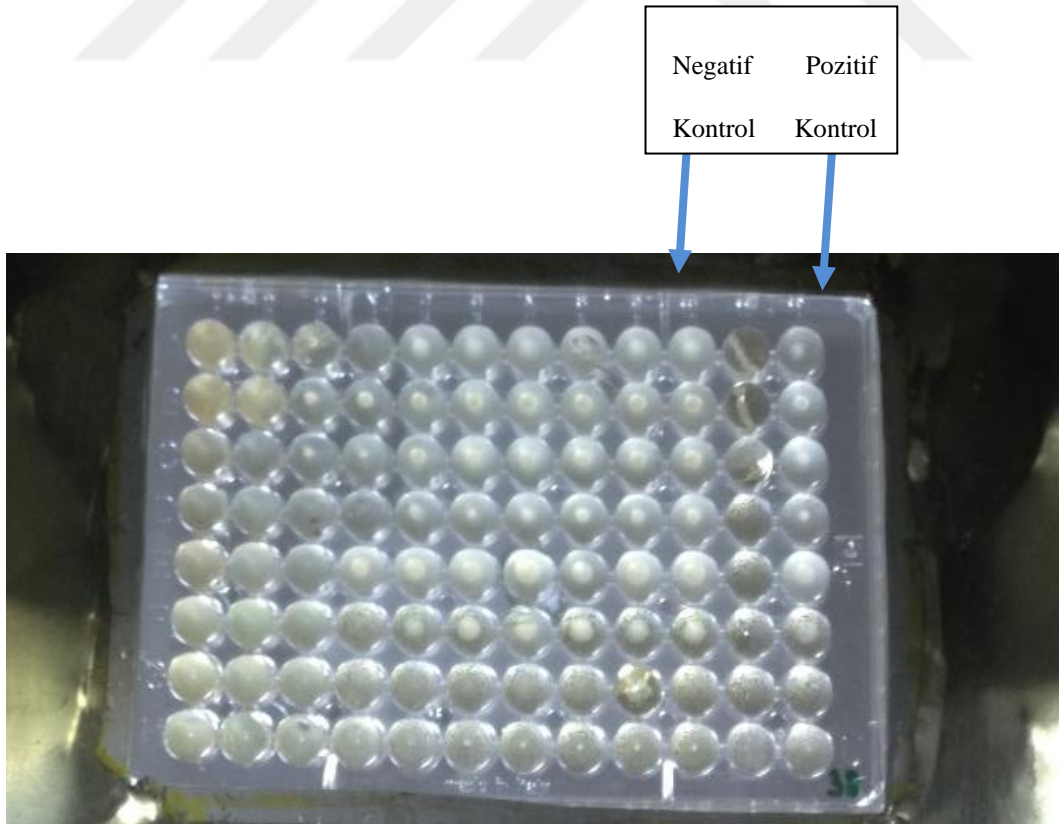
5.5.3. Antimikrobiyal aktivite sonucu

Ham ekstrenin antibakteriyal ve antifungal aktivitesine bakılmıştır. Çizelge 5.4 sekiz farklı patojene karşı in vitro antimikrobiyal etki sonuçlarını göstermektedir. Pozitif kontrol kuyucuğunda çözücü ve/veya besiyeri kaynaklı bir inhibisyon olmamış ve üreme görülmüştür. Negatif kontrol kuyucuğunda ise herhangi bir üreme görülmemiştir.

Bakteriler için 24 saat sonunda ve maya türleri için 48 saat sonunda okumalar yapılmıştır. Şekil 5.19' da 24 saat sonunda plağın görünümü verilmiştir. Ekstrenin, *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002, *Staphylococcus aureus* JCSC 4744, *Cryptococcus neoformans* NIH 68, *Cryptococcus gattii* NIH 112 türlerine karşı düşük seviyede antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür.

Çizelge 5.4 Ekstrenin minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri

Mikroorganizma	MİK, µg/ ml
<i>Acinetobacter haemolyticus</i> ATCC 19002	32
<i>Acinetobacter septicum</i> (GATA Microbiology – NRB 239)	128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CDC 529	128
<i>Staphylococcus aureus</i> JCSC 4744	32
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	128
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	128
<i>Cryptococcus neoformans</i> NIH 68	32
<i>Cryptococcus gattii</i> NIH 112	32



Şekil 5.19 24 saat sonunda plakanın görünümü

5.5.4. Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi sonucu

Yüzde inhibisyonun % 40'ın üzerinde olduğu durumlarda ekstrenin asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi olduğu söylenebilir. Pozitif kontrol olarak kullanılan galantaminin % 86 inhibisyon gösterdiği deneyde, ham ekstrenin inhibisyon aktivitesinin % 40'ın altında kalması nedeniyle inaktif olduğu görülmüştür.



6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Deniz kaynaklı doğal ürünlerin de sahip olduğu biyoaktiviteler farmasötik endüstrisi için ilgi çekici bir sahadır. Aynı trendleri takip ederek kozmetik endüstrisi için de deniz yeni bileşiklerin keşfi için uygun bir alan haline gelmiştir. İlaç olarak piyasada bulunan Prialt®, Lovaza®/Omacor®, Halaven®, Adcetris®, Carragelose®, Yondelis ® gibi ürünler deniz kaynaklıdır ve bundan sonra yapılacak çalışmalar için denizin ne kadarengin bir kaynak olduğunun ispatı niteliğindedir.

Türkiye’de, tunikatların da dahil olduğu Kordalılar filumu 64 farklı türü barındırarak tür sayısı bakımından ikinci sırada yer alır. Bu 64 tür içerisinde ise 61 türle tunikatlar alt-filumu en fazla üyeye sahiptir (11). Üç tarafı denizle çevrili Türkiye’de, bu türlerle yapılacak çalışmalar bu türlere ait molekülleri açığa çıkaracak ve biyoaktivite çalışmalarının ardından uygun adayların faz çalışmalarına alınmasına yönelik adımlar atılmasına yol açacaktır.

Microcosmus vulgaris’ den 2000 yılında yapılan çalışmada, in vitro olarak, antiproliferatif etki göstermiş olan yeni bir n- metilpiridinyum alkaloiti izole edilmiştir (29). 2002 yılında gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, yeni bir glikosfingolipit olan sulkakeramit, perasetat formu olarak izole edilmiştir (30). 2003 yılında yapılan çalışmada, üç yeni glikosfingolipit, perasetatları olarak izole edilmiştir (31).

Bu çalışmada da Kordalılar şubesine ve Ascidae sınıfına dahil bir tunikat olan *Microcosmus vulgaris* ile çalışılmıştır. n- Bütanol VSK-2’den bir sterol olan 5 α - 6 α - epoxyergosta 7-en- 3 β - ol izole edilmiştir. İzole edilen 5 α - 6 α - epoxyergosta 7-en- 3 β - ol’ün de antioksidan etkisine bakılmıştır. Bileşiğin aktivitesi, ham ekstreninkinden fazla olsa da dikkate değer bir aktivite değeri okunmamıştır.

Ham ekstrenin sitotoksik, antioksidan, antimikrobiyel ve asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitelere bakılmıştır. Ham ekstrenin Hep-2 hücreleri (Human epidermoid cancer cells)’ ne karşı sitotoksik aktivitesi incelenmiş ve IC₅₀ değeri 40.0754 μ g/ ml olarak tespit edilmiştir. Antioksidan aktivitesi ise süperoksit radikali süpürücü aktivitesine bakılmış ve 800 μ g/ ml konsantrasyonda % 10’un altında bir aktivite göstermiştir. Bu sebeple SO radikal süpürücü etkisi yok denecek kadar azdır. Ham ekstrenin, antibakteriyel ve antifungal aktivitesine bakılmıştır. Ekstrenin, *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002,

Staphylococcus aureus JCSC 4744, *Cryptococcus neoformans* NIH 68, *Cryptococcus gattii* NIH 112 türlerine karşı düşük seviyede antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür. Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesine bakılmış ve ham ekstrenin inhibisyon aktivitesinin % 40'ın altında kalması nedeniyle inaktif olduğu görülmüştür.

Yapılan bu izolasyon çalışması, *Microcosmus vulgaris* türü ile Türkiye' de yapılan ilk çalışmadır. Bu aşamadan sonra izole edilen madde ve ham ekstrenin farklı biyoaktiviteleri incelenebilir. Biyoaktivitenin yüksek olduğu deneylerde, ileri çalışmalara geçilebilir.

Türkiye' de deniz kaynakları üzerine diğer tunikat türleri ile yapılacak çalışmaların sonuçları, bilim dünyasına katkı sağlayacak ve ardından ilaç kaynağı olarak üretimin yollarını açabilir.



7. KAYNAKLAR

1. Martins A, Vieira H, Gaspar H, Santos S. Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. *Mar Drugs*. 2014;12(2):1066–101.
2. Cooper EL, Yao D. Diving for drugs : tunicate anticancer compounds. *Drug Discov Today*. Elsevier Ltd; 2012;17(11-12):636–48.
3. Butler MS, Robertson AAB, Cooper MA. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat Prod Rep* [Internet]. Royal Society of Chemistry; 2014;31:1612–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C4NP00064A>
4. Kijjoa A, Sawangwong P. Drugs and Cosmetics from the Sea. *Mar Drugs*. 2004;73–82.
5. Mehbub MF, Lei J, Franco C, Zhang W. Marine Sponge Derived Natural Products between 2001 and 2010: Trends and Opportunities for Discovery of Bioactives. *Mar Drugs*. 2014;12(8):4539–77.
6. Kim S-K. *Marine Pharmacognosy: Trends and Applications*. CRC Press; 2012.
7. NASA Earth Observatory. The Water Cycle [Internet]. [cited 2016 Jan 10]. Available from: <http://earthobservatory.nasa.gov/Features/Water/page1.php>
8. Marine Species [Internet]. [cited 2017 Jan 11]. Available from: <http://www.marinespecies.org/>
9. Dias DA, Urban S, Roessner U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*. 2012;2(2):303–36.
10. Menna M, Aiello A. Handbook of marine natural products. In: *Handbook of marine natural products*. 2012. p. 296–365.
11. Çinar ME. Checklist of the phyla Platyhelminthes , Xenacoelomorpha , Nematoda , and Hemichordata) from the coasts of Turkey. *Turkish J Zool*. 2014;38:698–722.
12. Konuklugil B. Secondary Metabolites from Marine Sources: Review. *Turkiye Klin J Pharm Sci*. 2016;5(2):110–7.
13. F. Harvey Pough, Christine M. Janis JBH. *Omurgasızlar biyolojisi*. 6th ed. Edt. Sözen M, editor. Nobel yayıncılık; 2013. 606 p.
14. Hickman C, Keen S, Larson A ED. *Integrated Principles of Zoology*. 14th ed. 2008. 915 p.


15. Shenkar N, Swalla BJ. Global diversity of Ascidiacea. *PLoS One*. 2011;6(6):1–12.
16. Imperatore C, Aiello A, D’Aniello F, Luciano P, Vitalone R, Meli R, et al. New Bioactive Alkyl Sulfates from Mediterranean Tunicates. *Molecules*. 2012;17(1):12642–50.
17. Kobayashi J, Cheng J, Nakamura H, Ohizumi Y. Ascididemin , a novel pentacyclic aromatic alkaloid with potent antileukemic activity from the okinawan tunicate *Didemnum* sp. *Tetrahedron Lett*. 1988;29(10):1177–80.
18. Matsumoto, Sandra S. BJ, Copp BR, Holden JA, Barrows LR. Mechanism of Ascididemin-Induced Cytotoxicity. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2003;16(2):113–22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12588181>
19. Tourneau C Le, Ciruelos EM, Lopez-martin JA. Reports of Clinical Benefit of Plitidepsin (Aplidine), a New Marine-Derived Anticancer Agent , in Patients With Advanced Medullary Thyroid Carcinoma. *Am J Clin Oncol*. 2010;33(2):132–6.
20. Lindquist N, Fenical W, Duyne GD Van, Clardy J. Isolation and structure determination of diazonamides A and B, unusual cytotoxic metabolites from the marine ascidian *Diazona chinensis*. *J Am Chem Soc*. 1991;113(6):2303–4.
21. Diazonamide A [Internet]. [cited 2017 Jan 3]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10478902.html>
22. Didemnin B [Internet]. [cited 2017 Jan 4]. Available from: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=68856>
23. Chun HG, Davies B, Hoth D, Suffness M, Plowman J, Flora K, Grieshaber C L-JB. Didemnin B. The first marine compound entering clinical trials as an antineoplastic agent. *Invest New Drugs*. 1986;4(3):279–84.
24. Patel RM. Trabectedin : A novel molecular therapeutic in cancer. *Int J Curr Pharm Res*. 2011;3(3):65–70.
25. Incalci MD, Galmarini CM. A Review of Trabectedin (ET-743): A Unique Mechanism of Action. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(8):2157–63.
26. Galmarini CM, Incalci MD, Allavena P. Trabectedin and Plitidepsin: Drugs from the Sea that Strike the Tumor Microenvironment. *Mar Drugs*. 2014;12:719–33.
27. Michael C. Edler, Annette M. Fernandez, Peter Lassota, Chris M. Ireland LRB. Inhibition of tubulin polymerization by vitilevuamide, a bicyclic marine peptide, at a site distinct from colchicine, the vinca alkaloids, and dolastatin 10. Michael C Edler,

- Annette M Fernandez, Peter Lassota, Chris M Ireland, Louis R Barrows. 2002;63(4):707–15.
28. Fojo AT (Ed. . The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology. Tito A, editor. 2008. 249 p.
 29. Aiello A, Fattorusso E, Menna M, Iuvone T. Sulcatin , a Novel Antiproliferative N - Methylpyridinium Alkaloid from the Ascidian *Microcosmus vulgaris*. *J Nat Prod*. 2000;63(4):517–9.
 30. Aiello A, Fattorusso E, Mangoni A, Menna M. Sulcaceramide , a Novel Triglycosylceramide from the Marine Ascidian *Microcosmus sulcatus*. *European J Org Chem*. 2002;2(31):1047–50.
 31. Aiello A, Fattorusso E, Mangoni A, Menna M. Three New 2 , 3-Dihydroxy Fatty Acid Glycosphingolipids from the Mediterranean Tunicate *Microcosmus sulcatus*. *European J Org Chem*. 2003;734–9.
 32. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition M07-A9. Clin Lab Stand Institute, Wayne, PA. 2012;
 33. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard Third Edition M27-A3. Clin Lab Stand Institute, Wayne PA. 2008;(April).
 34. Orhan IE, Ozcelik B, Konuklugil B, Putz A, Kaban UG, Proksch P. Bioactivity Screening of the Selected Turkish Marine Sponges and Three Compounds from *Agelas oroides*. *Rec Nat Prod*. 2012;4:356–67.
 35. Tōugu V. Acetylcholinesterase : Mechanism of Catalysis and Inhibition. *Curr Med Chem Cent Nerv Syst Agents*. 2001;1:155–70.
 36. Hasnat MA, Pervin M, Ou Lim B. Acetylcholinesterase Inhibition and in Vitro and in Vivo Antioxidant Activities of *Ganoderma lucidum* Grown on Germinated Brown Rice. *Molecules*. 2013;18(6):6663–78.
 37. Houghton PJ, Ren Y, Howes M-J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat Prod Reportsat Prod Rep*.. 2006;23(2):181–99.
 38. Xu S, Liao X, Du B, Zhou X, Huang Q, Wu C. A series of new 5 , 6-epoxysterols from a Chinese sponge *Ircinia aruensis*. *Steroids*. 2008;73:568–73.

39. Wafaa Hassan RAE, Ebel R, Wray V, Proksch P. New Alkaloids from the Mediterranean Sponge *Hamigera hamigera*. *Mar Drugs*. 2004;2:88–100.
40. *Microcosmus vulgaris* Heller, 1877 [Internet]. [cited 2016 Jul 21]. Available from: <https://inpn.mnhn.fr/photos/uploads/webtofs/inpn/4/144194.png>



8. ÖZGEÇMİŞ



INFO

Name
Melek Sertdemir

Address
Ertugrugazi Mah. Serenler Sok. 6/6
Cebecli/Çankaya Ankara

Phone
+90 544 483 5569

Email
meleksertdemir@gmail.com
msertdemir@ankara.edu.tr

INTERESTS

Competitive Latin Dancing

Reading

Spinning

AWARDS

2012 Inter-University Dance Competition
Best Woman Dancer

Multiple Awards at TDSF Dance League

REFERENCES

Belma Konuklugil
Prof. Dr. at Ankara University
Faculty of Pharmacy
Contact : +90 312 203 3092
konuklug@pharmacy.edu.tr

Uğur Ergül
Sales Manager at Coca Cola
Contact: +90 532 558 3896

MELEK SERTDEMİR

CHEMICAL ENGINEER



WORK EXPERIENCE

- 2014 - 2016 **Ankara University Faculty Of Pharmacy**
Early Stage Researcher
Worked on isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites from marine organisms at TUBITAK - CNR (ITALY) project titled 'Chemical and ecological study of some Turkish coasts benthic invertebrates.'
Assisted on the project titled 'Bioactive compounds from Turkish marine macro organism and associated fungi for EU industries' funded by EU - FP7-PEOPLE



EDUCATION

- 2015 - 2017 **Ankara University, Institute Of Biotechnology, Ankara**
Master Degree in Biotechnology
GPA: 3, 53/4, 00
- 2008 - 2014 **Ankara University, Ankara**
Bachelor degree in Chemical Engineering
GPA: 2, 33/4, 00
- 2004 - 2008 **Mustafa Kaya Anatolian High School, Kastamonu**
GPA: 83 / 100



SKILLS AND EXPERTISE


English	=====	MS Excel	=====
HPLC	=====	MS Word	=====
ChemCAD	=====	MS Powerpoint	=====
Critical Thinking	=====	Pharmacy	=====
Production and Processing	=====	MatLab	=====



CERTIFICATES AND PUBLICATIONS

- S.S. Aydın, Y.Genc, M.Sertdemir, S. Korpavev, B. Gözcelioğlu, B. Konuklugil, U.S. Harput. Superoxide Radical Scavenging and Cytotoxic Effects of different Marine Species from Turkey's Coast. Good Practice in Traditional Chinese Medicine Research Ass. 4th Annual Meeting, 2015, Belgium. (Poster Presentation)**
- M.Sertdemir, B. Gözcelioğlu, B. Konuklugil. Isolation and Structure Elucidation of 5-6-Epoxy Sterol From Acidian Microcoemus vulgaris. The Third International Conference on New Trends in Chemometrics and Applications, 2016, Turkey (Poster Presentation)**
- Y. Genc, S.S. Aydın, M. Sertdemir, O. Demir, E.S. Okudan, S. Salin, B. Konuklugil, U.S. Harput. Bioactivity studies of algal extracts from Turkey's Mediterranean coast. Planta Medica, 82(S 01): S1-S381, 2016**
- OHSAS 18001:2007 Occupational Health and Safety Management System Internal Auditor, ISO 14001: 2004 Environmental Management System Internal Auditor, ISO 9001: 2008 Quality Management System Internal Auditor
- Coursovia Certificate: Matlab Programming for Engineers (Certificate No: UC-Y5R6A2NI)


9. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR



ISOLATION AND STRUCTURE ELUCIDATION OF 5- 6- EPOXY STEROL FROM ASCIDIAN *Microcosmus vulgaris*

Melek Sertdemir¹, Bülent Gözcüoğlu², Belma Konuklugil¹

¹Ankara University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 06100, Ankara, Turkey
²The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK), Ankara, Turkey



INTRODUCTION

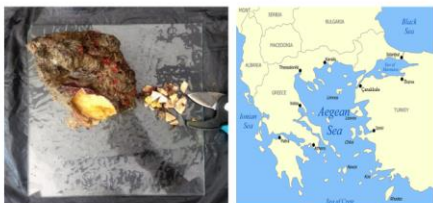
Isolation of natural products is the very first step for a product which can be apply to pharmaceutical industry. For this purpose, lost of natural products have been isolated and with long time studies they became products to use as pharmaceuticals, cosmetics, nutritional supplements, molecular probes, fine chemicals and agrochemicals (1). Isolation of natural products from marine organisms is a new trend in the world and especially in Turkey. In recent years, a significant number of novel metabolites with potent pharmacological properties has been discovered from the marine organisms (1). Attention has been focused more recently on ascidians because of their biologically active metabolites (2). Trabectedin is a novel alkaloid and the active substance of Yondelis® which is isolated from a tunicate *Ecteinascidia turbinata*. Trabectedin was found to be especially effective against solid tumors. Aplidin® and Lurbinectedin 173 are compounds isolated from tunicates *Aplidium albicans* and *Ecteinascidia turbinata* that still in Phase III and Phase II studies for cancer treatment (3). When we look at the novel products which are isolated from tunicates, they don't have a big percentage (4). Ascidians have a great potential to be discovered by scientists.

MATERIAL AND METHODS

RESULTS

Material

Microcosmus vulgaris collected by scuba-diving by Dr. Bülent Gözcüoğlu from Aegean Sea. Sample cut into small pieces. Figure 1 shows *Microcosmus vulgaris* and diving area.



Methods

Extraction Method

Sample which cut into small pieces before extracted with choloform-methanol (1: 1) three times. Solvent evaporated with rotary evaporator and extract put into freeze dryer to get rid of water. Dry extract yielded 40 grams in total.

Isolation Procedure

Liquid- Liquid Partitioning

20 grams of extract dissolved in Methanol- Water (90:10) and partitioned with n- hexan, ethyl acetate, n- butanol.

Vacuum Liquid Chromatography (VLC)

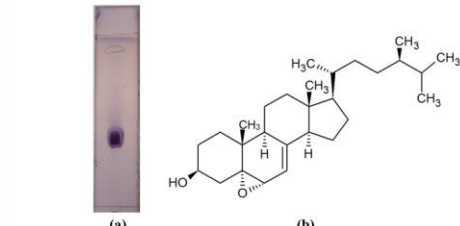
n- Butanol fraction applied to VLC with the given system in Table 1. Twelve fractions gained and Fraction-2 chosen for further studies.

Table 1. Column specifications and elution system for VLC

Column Specifications		Elution System	
Column diameter	10 cm	n- Hexan	➡ Ethyl Actete
Column height	10 cm	Dichloromethane	➡ Methanol
Stationary phase	Silica gel		

Several chromatography technics like coloumn chromatography, thin layer chromatography used for isolation and analysis.

Tunicate sample was homogenized and extracted with choloform-methanol (1:1). This extract was then subjected to repeated column chromatography, to obtain steroids. Isolation of 5- 6- Epoxy sterol from n- butanol fraction was done by coloumn chromatography with using silica gel as stationary phase and dicholoromethane- methanol with gradient elution as mobile phase. Initial analysis for compound done by Thin Layer Chromatogphy (TLC). TLC result of this compounds is given in Figure 2a. Structure elucidation of 5α- 6α- epoxyergosta 7-en- 3β- ol (Figure 2b) was done by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. This compound had the composition C₂₈H₄₆O₂ established on the basis of the 13C NMR and H NMR data. The significant fragment ions at m/z 269 [M-H₂O-C₉H₁₉]⁺ indicated the presence of a C₉H₁₉ side-chain (5).



CONCLUSIONS

Isolation of 5- 6- epoxy sterol from tunicate *Microcosmus vulgaris* was done by chromatographic methods and structure elucidation was done by NMR Spectroscopy.

The next step will be determine cytotoxic, antioxidant, antimicrobial activities.

References:

- Kijjoo A, Sawangwong P. Drugs and Cosmetics from the Sea. Mar Drugs. 2004;73-82.
- Kim S-K. Marine Pharmacognosy: Trends and Applications. CRC Press; 2012.
- Martins A, Vieira H, Gaspar H, Santos S. Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. 2014;1066-101.
- Mehbub MF, Lei J, Franco C, Zhang W. Marine Sponge Derived Natural Products between 2001 and 2010: Trends and Opportunities for Discovery of Bioactives. 2014;4539-77.
- Xu S, Liao X, Du B, Zhou X, Huang Q, Wu C. A series of new 5-, 6 epoxysterols from a Chinese sponge *Ircinia arvensis*. 2008;3:568-73.

Acknowledgment

This study supported by the project number 113ZB37 and named as 'Chemical and Ecological Study of Some Turkish Coasts Benthic Invertebrates' by The Scientific And Technological Research Council Of Turkey (TUBITAK).

NTCA2016

Antalya, May 25-28, 2016

[http://ntca.ankara.edu.tr/](http://ntca.ankara.edu.tr)