

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENİZ MERCANLARINDAN *PARAMURICEA CLAVATA*'NİN BİYOAKTİF
ETKEN MADDELERİNİN İZOLASYONU VE TAYİNİ

Serdar KORPAYEV

Ağustos

2015

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENİZ MERCANLARINDAN *PARAMURICEA CLAVATA*'NİN BİYOAKTİF
ETKEN MADDELERİNİN İZOLASYONU VE TAYİNİ

Serdar KORPAYEV

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Belma KONUKLUGİL

Ağustos

2015

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.

Serdar Korpayev



ONAY

Prof. Dr. Belma KONUKLUGİL danışmanlığında Serdar Korpayev tarafından hazırlanan bu çalışma 05.08.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Şebnem HARPUR

İmza:



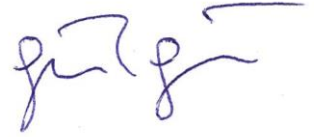
Üye: Prof. Dr. Belma KONUKLUGİL

İmza:



Üye: Prof. Dr. Gülgün OZANSOY

İmza:



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Deniz mercanlarından *Paramuricea clavata* 'nın biyoaktif etken maddelerinin izolasyonu
ve tayini

Serdar KORPAYEV

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Belma KONUKLUGİL

Doğa, asırlar boyunca çeşitli hastalık tedavilerine kaynaklık etmiştir. Dünyanın %70'lik ana birleşeni okyanuslar şüphesiz hayatımızda önemli yere sahiptir. Son 40 senede skuba aletlerinin ortaya çıkmasıyla birlikte okyanuslar bilim adamlarının dikkatini çekmeyi başarmıştır. Okyanuslar, biyoçeşitlilik ve üretkenlik alanları olup bazı benzersiz kimyasal yapılara kaynaklık etmektedir. Bunların bazıları farmakolojik aktiviteler göstermiştir. Antikanser, anti-HİV, antiinflamatuvar, antimalarial, antitüberküloz, antimikrobiyal ve benzeri hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak Vidarabin (Vira-A) antiviral ilaç olarak viral DNA polimerazı inhibe eder ve ET-743, Aplidin ve Kahalalide F bileşiklerin katı tümörlere karşı pozitif terapötik etkisinin olduğu saptanmıştır. Son 40 senede izole edilen deniz kaynaklı bileşiklerin sayısı 10,000'i aşmıştır. Dolayısıyla, multidisipliner çalışmalar sayesinde deniz canlılarından izole edilebilecek yeni sekonder metabolitler, klinikte kullanılabilecek yeni ilaçların çeşit ve sayısını artırma potansiyeline sahip olabilecektir.

Bu tez çalışmasında Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde Türkiye'nin Ege denizi kıyısı Ayvalıktan toplanan deniz omurgasızlarından Knidliler türü olan deniz mercanlarından *Paramuricea clavata* ekstresinin Hep-2 hücrelerinde sitotoksik ve yüksek radikal süpürücü biyolojik aktivite gösteren *Paramuricea clavata*'nın, etken madde izolasyonu ve yapı tayinleri araştırılmıştır. Kimyasal analiz sonucunda iki madde izole edilmiş ve bunlardan bir tanesinin β -sitosterol olduğu bulunmuştur. İkinci maddenin ise saflaştırma işlemine ve yapısının aydınlatılmasına devam edilmektedir. YSBK analizi ile karşılaştırma sonucunda ise Anetol, Anikuaizolin A, C, D, Dioksoindol, Papirasillik asit C maddelerinin bulunduğu düşünülmekte olup, izolasyon çalışmaları ile yapıları doğrulanacaktır.

2015, 62 sayfa

Anahtar kelimeler: Deniz Canlıları, *Paramuricea clavata*, Biyolojik Aktivite

ABSTRACT

MSc Thesis

Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites from

CnidariaParamuricea clavata

Serdar KORPAYEV

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Belma KONUKLUGİL

Nature has been instrumental as a source for therapeutics. Despite the fact that we live in an oceanic planet, a number of technical factors have historically prevented the evolution of a marine-based medicine. With the implementation of scuba diving tools and the development of sophisticated instruments for the isolation and elucidation of structures of natural products from marine organisms, major advances have been made in the discovery of marine derived therapeutics. Marine is an excellent source of bioactive secondary metabolites with potential biodiversity and unique therapeutic value in the treatment of diseases (Anti-HIV, Anti-tumor...). To illustrate, Vira-A inhibit the DNA polymerase and ET-743, Aplidin and Kahalalide F, have been shown to display a positive therapeutic index and activity in resistant solid tumors that supports the ongoing clinical phase III/II trials. In the latest years, the isolated marine compounds are over 10.000. Moreover, the development of a given marine candidate implies the collaboration of an interdisciplinary team special focused on supply, biology, oceanography, formulation, pharmacogenetics and preclinical toxicology. The further work is in progress to determine its activity profile relative to marine compounds and other drugs of this class.

In this work in Ankara University Biotechnology Institution, we investigated the *Paramuricea clavata* having high biological activity (cytotoxic to the Hep-2 and radical scavenging) belonging to Cnidariacollected from Ayvalık, Aegean sea coast of Turkiye and elucidated the structures of the isolated compounds. Two compounds are isolated. First compound is β -sitosterol. Second compound is being tried for further identification. Compounds; Anethole, Aniquinazoline A,C,D, Benzodiazepine, Dioxoindole, Papyracillic acid C are detected by using HPLC.

2015, 62 pages

Keywords: *Paramuricea clavata*, Marine organisms, Bioactivity.

TEŞEKKÜR

Farklı bir alandan gelerek Biyoteknolojinin kişisel heyecanımı yöneltebileceğim ve karşılıklı bir fayda oluşturabileceğim bir alan olduğunu yüksek lisansım itibarıyla öğrenmiş bulunuyorum. Tez konumu belirleyen ve çalışmalarımın her aşamasında gecesini gündüzüne katarak beni destekleyen ve hiçbir yardımını esirgemeyerek bana hocalıktan ötürü yakınlığıyla heran yanımda olarak destekleriyle beni yalnız bırakmadığı için değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Belma Konuklugil'e,

Çalışma boyunca en küçük konularda bile anında dönerek bana yardımcı olan ve eleştirilerini hiçbir zaman benden esirgemeyen ve bana bilimsel bakmayı öğreterek hayatıma en büyük katkılardan birini veren Sayın Prof. Dr. Hilal Özdağ'a

Benim yoğun zamanlarımda yardımlarının esirgemedi bana yardım etme fedakarlığında bulunan ve bana hep teselli verme gayretini gösteren sevgili biricik lab arkadaşım Melek Sertdemir'e,

Proje ortaklarımızdan Hacettepe Üniversitesinden Prof. Dr. Şebnem Harput ve Araş.görev. Seçil Sarıkaya ve Yasin Genç'e

Ankara Üniversitesine ortak proje kapsamında gelen ve deneylerim boyunca katlarıyla destekçinli iki arkadaşına Lee Ve Xu'a,

Örneklerin toplanmasında ve örneklerin özellikleriyle ilgili her konuda yardım ve desteğini hissettiğim Dr. Bio. Bülent Gözcelioğlu'na ve çalışmalarım sırasında her konuda yardım ve desteğini hissettiğim isimlerini burada saymadığım tüm arkadaşlarıma,

Ayrıca, hayatım boyunca sevgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili anne-babama ve eşime sonsuz şükranlarımı sunarım.

Son olarak, yüksek lisans dönemim boyunca, mali olarak destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TESEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	VI
SEKİLLER DİZİNİ	ix
CİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	5
2.1. KNİDLİLER= CNİDARIA	5
2.1.1. Knidlilerin genel özellikleri.....	5
2.1.2. Knidlilerin vücut yapıları.....	6
2.1.3. Ektoderm	6
2.1.4. Döl değişimi	7
2.1.5. Polip.....	7
2.1.6. Medüzler.....	7
2.1.7. Hareket.....	8
2.1.8. Ekolojileri Ve Yaşam Tarzları.....	8
2.1.9. Sistematikleri	9
2.2. SINIF: ANTHOZOA (MERCANLAR)	11
2.2.1. Biyolojik Aktiviteler.....	13
2.2.2. Diğer Knidliler Sekonder Metabolitleri ve Aktiviteleri	15
2.2.3. Dünya Üzerinde Yayılış	17
2.2.4. Türkiye Denizlerinde bulunan Knidliler türleri.....	17
2.2.5. <i>Paramuricea clavata</i>	19
2.2.6. Kaynak Özetleri.....	21
3. GEREKÇE VE AMAC	24
3.1. Çalışmanın Amacı	24
4. MATERYAL ve YÖNTEM	25

4.1. ARAŞTIRMA MATERYALİ	25
4.1.1. <i>Paramuricea clavata</i>	25
4.1.2. Kullanılan Kimyasallar.....	25
4.2. YÖNTEM	26
4.2.1. Ekstraksiyon	26
4.2.2. Ekstrenin Vakum Sıvı Kromatografisi (VSK) ileFraksiyonlaraKaba Ayırımı	26
4.2.3. Elüsyon Sistemi	27
4.2.4. İzolasyon.....	29
4.2.5. Kromatografik Yöntemler	29
4.2.6. İzole edilmiş bileşikler yapı aydınlatılması	33
4.3. BİYOAKTİVİTE BULGULAR	34
4.3.1. Hep-2 hücrelerinde dizileri üzerinde sitotoksik etki incelemesi	34
4.3.2. Radikal süpürücü etki incelemesi.....	34
<u>5. ARASTIRMA BULGULARI</u>	36
5.1. İTK ve YSBK ANALİZ SONUÇLARI	36
5.1.1. Mercan <i>Paramuricea clavata</i> 'nın metanol: kloroform (1:1) ekstresinin YSBK analizi	36
5.1.2. Fraksiyon 3 Fazının YSBK sonuçları.....	36
5.1.3. VSK ile elde edilen Fraksiyon 3'ün İTK Analizi	37
5.1.4. VSK ile elde edilen 3 no'lu Fraksiyondan Kolon Kromatografisi ile elde edilen Çökmüş olan Maddenin İTK Analizi	37
5.1.5. İzole edilen örnek 1'in kloroform:methanol (100:1) çözücü sisteminde İTK analizi	38
5.1.6. Farklı solvanlaelde edilen örnek 1'in İTK analizi sonucu.....	39
5.1.7. İzole edilenörnek 1'inYSBK Analizi.	40
5.1.8. Preparatif İTK ile izole edilen örnek 1'in UV spektrumu	40
5.1.9. Madde 1'in literatür UV Spektrumu.....	40
5.2. İZOLE EDİLEN BİLEŞİKLERİN NMR ANALİZ SONUÇLARI	41
5.2.1. β -Sitosterol	41
5.2.2. İzole edilmiş örnek 1 NMR analiz sonuçları	42
5.2.3. β -Sitosterol NMR bulguları	44
5.2.4. İzole edilen ikinci madde örnek 2 sonuçları	45
5.3. ÖRNEK 2 SONUÇLARI	47
5.4. ETKİLİ MADDELERİN YSBK İLE TESPİTİ	47

5.4.1. Fraksiyon 3'ün diğer etkili maddelerinin YSBK ile tespiti.....	47
5.4.2. Fraksiyon 2, 5, 6 ve 7'deki etkili maddelerin YSBK ile tespiti.....	48
5.5. BİYOAKTİVİTE BULGULAR	51
5.5.1. Hep-2 hücrelerinde dizileri üzerinde sitotoksik etki incelemesi	51
5.5.2. Radikal süpürücü etki incelemesi	52
<u>6. TARTISMA VE SONUC</u>	<u>54</u>
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>57</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>61</u>
<u>TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR</u>	<u>62</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Deniz kaynaklarının biyoaktif bileşiklerinin sayısı.....	4
Şekil 2.1.	Knidlilerin en çok çalışılan altgrupları.....	10
Şekil 2.2.	Son on senede çalışılan filum Knidliler'nin yüksek biyoteknolojik öneme sahip biyoaktif sekonder metabolitler ilaç sınıfları	10
Şekil 2.3.	Son on senede çalışılan filum Knidliler'nin yüksek biyoteknolojik öneme sahip biyoaktif bileşikleri	11
Şekil 2.4.	Parazoantoksantin A.....	16
Şekil 2.5.	Knidliler türlerinin dünya üzerindeki yayılışı	17
Şekil 2.6.	Türkiye Knidliler türlerinin bulunduğu Denizlere göre Knidliler sayıları	18
Şekil 2.7.	Türkiye kıyılarının yeni anthozoa türlerinin bulunduğu harita	19
Şekil 2.8.	Türkiye Ayvalıkta Bülent Gözcelioğlu tarafından çekilmiş <i>Paramuricea clavata</i>	21
Şekil 2.9.	Triptofan ve türevleridir	21
Şekil 2.10.	Kafein	22
Şekil 2.11.	Guaiazulen.....	22
Şekil 2.12.	İndol ve Pürin Alkaloitler.....	23
Şekil 4.1.	<i>Paramuricea clavata</i>	25
Şekil 4.2.	VSK.....	26
Şekil 4.3.	<i>Paramuricea clavata</i> ekstresinin madde izolasyonu akış şeması	28
Şekil 5.1.	<i>Paramuricea clavata</i> ekstresinin YSBK Kromatogramı	36
Şekil 5.2.	Analitik YSBK'de <i>Paramuricea clavata</i> 'nın 3. Fraksiyonunun kimyasal profili	36
Şekil 5.3.	VSK ile elde edilen Fraksiyon 3'ün İTK kromatogramı.....	37
Şekil 5.4.	3 no'lu Fraksiyondan Kolon Kromatografisi ile elde edilen çökmüş olan kısmının İTK kromatogramı.....	38
Şekil 5.5.	Toplanan fraksiyonlardan kloroform: metanol (100:1) metanolde çökmüş olan maddenin (örnek1) İTK Analizi Sonuçları	39
Şekil 5.6.	Farklı solvanla (petrol eteri: aseton (10:1)) elde edilen İTK sonucu	39
Şekil 5.7.	Örnek1'in YSBK Analizi	40
Şekil 5.8.	İzole örnek 1'inUV spektrumu.....	40

Şekil 5.9.	Literatüre taraması sonucunda izole örnek 1'in 206 nm UV spekturumu	40
Şekil 5.10.	β -Sitosterol	41
Şekil 5.11.	Çalışmada izole edilen örnek 1'in $^1\text{H-NMR}$ analiz sonuçları gösterilmiştir.....	42
Şekil 5.12.	Çalışmada izole edilen örnek 1'in $^{13}\text{C-NMR}$ analiz sonuçları gösterilmiştir.....	43
Şekil 5.13.	Örnek2 İTK Analizi Sonucu	45
Şekil 5.14.	Farklı çözücü sistemiyle (petrol eteri: aseton (10:1)) elde edilen İTK sonucu.....	46
Şekil 5.15.	3 no'lu fraksiyonun etken maddeleri.....	47
Şekil 5.16.	2 no'lu fraksiyonun son 3 fraksiyonun etken maddeleri	48
Şekil 5.17.	5 no'lu fraksiyonun maddeleri	49
Şekil 5.18.	6 no'lu fraksiyonun etken maddeleri.....	50
Şekil 5.19.	Metanol:kloroform ekstrenin etken maddeleri.....	51
Şekil 5.20.	Hep-2 hücrelerinde dizileri üzerinde sitotoksik etki inceleme sonucu	52
Şekil 5.21.	Radikal Süpürücü Etkisinin İncelemesi	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	2004-2015 Deniz Kaynakları İlaç Klinik Çalışmalar Listesi.....	3
Çizelge 2.1.	Knidliler Sınıfları.....	9
Çizelge 2.2.	Knidliler türlerinin bileşikleri ve onların biyoaktiviteleri.....	14
Çizelge 2.3.	P388 Lösemi sitotoksosite değerleri.....	16
Çizelge 4.1.	VSK ile kullanılan elüsyon sistemi.....	27
Çizelge 4.2.	YSBK çözücü sistemi	32
Çizelge 4.3.	YSBK çözücü sistemi	32
Çizelge 5.1.	Örnek 1 NMR sonuçları.....	44

SİMGELER DİZİNİ

ANT	Anthozoa
CUB	Cubozoa
DPPH	2,2-difenil-1,2-pikril hidrazil
DÜ	Doğal Ürün
g	Gram
HCT-8	İnsan Kolon Karsinoma Hücreleri
HEP-2	İnsan Epidermoid Karsinoma
HL-60	İnsan Lösemi Hücreleri
HYD	Hydrozoa
IC ₅₀	The half maximal inhibitory concentration (in vitro)
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
MD-MB-435	Melanoma hücre çizgisi
MTT	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NOAA	Okyanus Keşif ve Araştırma Programı
NUD	Nuda
OTC	Over the Counter
SCY	Scyphozora
STA	Staurozoa
TEN	Ctenophora
UV	Ultraviyole
VSK	Vakum Sıvı Kromatografisi
YSBK	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Dünyanın ana birleşeni okyanuslar şüphesiz hayatımızda önemli yere sahiptir. Yer yüzünün %70'ünü okyanuslar kaplamaktadır ve yeryüzünün %97'lik su kaynağını elinde bulundurmaktadır (1). Bu ince kara-deniz keşişim noktası gezegen üzerinde üretkenliğin ve çeşitliliğin en fazla olduğu çevredir. Her ne kadar limitli alanlar olsa da derin okyanus bölgelerinin bazı yerlerinin kominiteler de bir başka biyoçeşitlilik ve üretkenlik alanlarıdır (2). Denizbilimcilere göre okyanusların sadece %5'i araştırıldı. Her ne kadar okyanusların derinliklerinin çok keşfedilememiş olmasına rağmen, 230,000 bilinen türlerin habitat ve iki milyondan fazla deniz türünün var olduğu tahmin edilmektedir (3). Dünya okyanuslarında ne kadar canlı türün bulunduğu henüz tam olarak bilinmemektedir. Bunların içinde yer alan mikrobiyal türlerin sayısı yapılan çalışmalarla her gün artmakta olup bu sayı 1-2 milyona yaklaşmıştır (4). Bu deniz kaynaklarının içinden deniz omurgasızları önemli yere sahiptir. Knidiller filumu geniş 11,000 tür içermektedir (5). Bu filumdan son on yılda 3000'den fazla izole edilmiş olan bileşiğin yapısı aydınlatılmıştır (5). Günümüzde hastalıkların tedavisinde %87 oranında doğal ürünler veya doğal ürünlerle ilişkili sentetik, etkili maddeler kullanılmaktadır (6). Bu çalışmaların önemini anlayan ülkelerin başında Amerika Birleşik Devletleri gelmektedir. Devletin işlerinin önemli bir kısmı okyanuslarla ilgilidir ve ABD Gayri Safi Milli Hasılasının üçte biri kıyı bölgelerindedir. Okyanuslar sadece ulaşım sağlamakla kalmayıp birçok hastalığa çare olabilecek etkili maddelerin elde edilebileceği kaynak potansiyeline sahiptir. Okyanus Keşif ve Araştırma Programı NOAA Ofisi (National Oceanic and Atmospheric Administration) yeni denizaltı yaşam alanlarını, topluluklarını, türlerini, ve ekosistemlerin daha iyi anlaşılması da dahil olmak üzere yeni keşifler için ileri teknolojiyi kullanarak okyanusların henüz incelenmemiş bölgelerini araştırmaktadır. NOAA, insan hastalıklarının potansiyel tedavilerini, cevaplarını ve kaynakların sürdürülebilir kullanımını sağlamak yardımcıyla keşiflerle yeryüzündeki yaşamın köklerinin ipuçlarını ortaya çıkarmak için büyük çaba sarfetmektedir. Okyanus ekosisteminin dinamiklerini anlamak deniz kaynaklarının sürdürülebilir yönetimi için önemlidir.

Doğal karasal organizmalar doğal ilaçların en zengin kaynağı temsil etmekte olup, Birçok etkili madde bitkilerden elde edilmiştir. Friedrich Wilhelm Sertürner tarafından 1805 yılında *Papaver somniferum*'dan morfin izole edilmesi ile ilk doğal kaynaklı ilaç

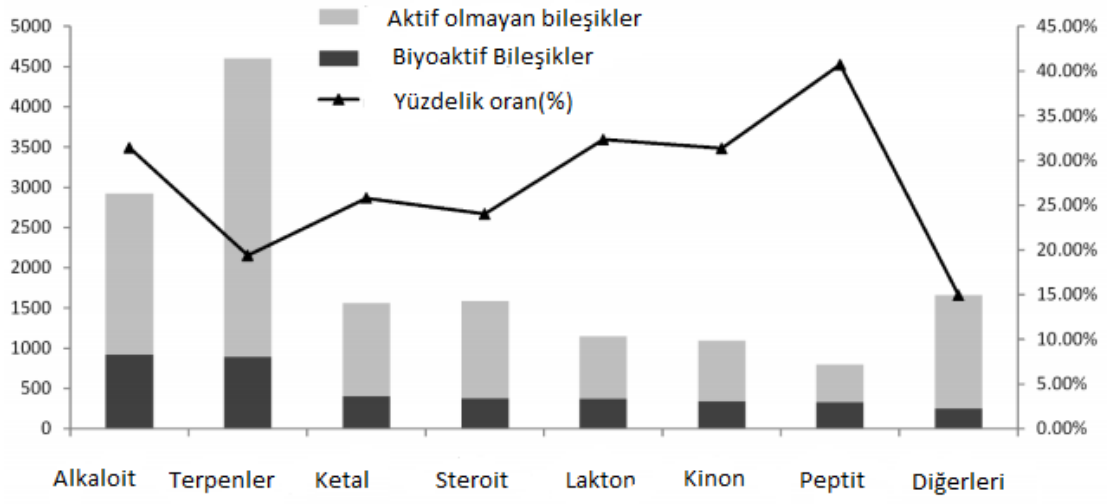
hammadesi elde edilmiştir. Fransız araştırmacılar Caventu ve Pelletier de sıtma tedavisinde kullanılan kinin alkaloidlerini *Cinchona sp.* kabuklarından elde etmişlerdir. *Taxus brevifolia* bitkisinden (örneğin paklitaksel (Taxol) sonradan endofitik mantar *Taxomyces andreanae* tarafından da üretildiği bulunmuştur ya da mikroorganizmalar (*Penicillium notatum*'dan örn penisilinler) gibi bitkilere sahiptir. Taxol, antikanser özellikleriyle bilinen bileşiklerdir (7). Bunların haricinde *Micromonospora chersina* bitkisinden de antibiyotik Dynemisin A izole edilmiş olup önemli tedavi aracı olarak kullanmışlardır. Bu keşifler giderek artmış ve günümüze kadar kodein, atropin, emetin, brusin gibi pek çok tedavi amaçlı bileşikler izole edilmiştir ve edilmeye devam etmektedir (8).

Karasal doğal organizmalarla birlikte okyanusların ekolojik, kimyasal ve biyolojik çeşitlilik, değişik kimyasal birleşiklere ve farmasötik potansiyele sahip olması okyanusları daha da gizemli yapmış ve araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Buldukları ortamların zorlu şartları deniz canlılarının değişik yapılarda ve çok çeşitli aktiviteler gösteren kimyasal maddeler üremelerine sebebiyet vermektedir. Son 40 seneye kadar, doğal kaynaklı ürünlerde yalnız kara canlıları varsayıлып ondan elde edilen etkili maddeler dikkate alınmaktaydı. Dalış tekniklerindeki gelişmeyle birlikte deniz kaynaklı ürünlerdeki biyoaktivite potansiyelinin dikkat çekmesiyle deniz canlıları üzerindeki çalışmalar hız kazanmıştır (6). Bergmann ve Feeney (1951) tarafından 1950'lerde sünger *Tethya crypta* nükleozit türevlerinin bulunmasına rağmen, genellikle, prostaglandin türevlerinin Karayipler gorgonundan *Plexaura homomalla*'dan izolasyonu deniz kimyasının başlangıç noktası olarak kabul edilmektedir (2). Daha sonra, Ara-A (Vidarabin) gibi viral enfeksiyonlar kemoterapisi için geliştirilmiş nükleosit ilaçlar geliştirilmiştir. O zamandan bu yana 18.000 'den fazla farklı deniz doğal ürünleri izole edilmiştir (9). Toprak yüzeyinin %70'inden fazlasını okyanuslar tarafından kaplı olduğu gerçeğini göz önünde bulunduracak olursak denizler zengin biyoçeşitliliği için habitat sağlayarak biyoaktif bileşiklerin keşfi için uygun bir ortamın karasal ortama göre hayli önde görünmekte olup klinik çalışmalara 33 farklı deniz doğal ürünleri ya da doğal ürün türevleri dahil edilmiştir (10). İlginç olarak deniz ürünlerinin çoğu (süngerler, gömlekliler, bryozoanlar veya tunikatlar), klinik veya ön klinik çalışmalarda karasal çevrede türetilen bileşiklere göre daha çok yer almıştır (6).

2004-2015 yılları arasında deniz kaynaklarından elde edilen etkili maddelerin klinik çalışmaları Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. 2004-2015 Deniz Kaynakları İlaç Klinik Çalışmalar Listesi (11)

Bileşik İsimleri.	Doğal türünler veya Türü	Orijinal DÜ / Kaynak Organizma	Şirket / Kurum (Şehir, Eyalet, Ülke)	Terapötik (tedavi edici) Alan	Durum 2004	Durum 2009	Durum 2015
(Cytosar-U; Depocyt®)	DÜ Türü	Spongothymidine/ sünger <i>Cryptothethya Crypta</i>	Bedford (Bedford, OH, ABD); Enzon (Piscataway, NJ, ABD)	Kanser	FDA / EMEA Onaylı	Onaylı	Onaylı
Vidarabin (Vira-A®)	DÜ Türü	Spongothymidine/ sünger <i>Cryptothethya Crypta</i>	Kral Pharma (Tenafly, NJ, ABD)	Anti-viral	FDA / EMEA Onaylı	Onaylı	ABD'de durduruldu
Zikonotit (Prial®)	DÜ	ω-konotoksin / deniz salyangozu <i>Konus Magus</i>	Elan Corporation, (Dublin, İrlanda)	Nöro-Patik Ağrı	FDA Onaylı	FDA / EMEA Onaylı	Onaylı
Omega-3 asitli etil esterler (Lovaza®)	DÜ Türü	Omega-3 yağ asitleri / balık	GlaxoSmithKline (Brentford, UK)	Hipertriglisideremi	FDA Onaylı	FDA / EMEA Onaylı	Onaylı
Trabectedin (Yondelis®)	DÜ	Ekteinassidin 743 /gömlekli <i>Ecteinascidia turbinata</i> 'dan	PharmaMar (Colmenar Viejo, Madrid, İspanya)	Kanser	Faz II / III	EMEA Onaylı	EMEA Onaylı
Eribulin mesilat (Halaven®)	DÜ Türü	Halichondrin B /Sünger <i>Halichondria okadaï</i>	Eisai (Tokyo, Japonya)	Kanser	Faz I	Faz III	FDA / EMEA Onaylı
Brentuximab vedotin (SGN-35) (Adcetris®)	DÜ Türü	Dolastatin 10 / deniz tavşanı <i>Dolabella auricularia</i>	Seattle Genetik (Bothell, WA, ABD); Takeda GRDC (Osaka, Japonya)	Kanser	-	Faz II	FDA / EMEA Onaylı
İota-carrageen the (Carragelose®)	DÜ	İota-carrageen in / Algae redEucheuma / <i>Cnondus</i>	Marinomed (Vienna, Austria); Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany)	Antiviral Viral	-	-	(OTC)
Pliditpsin (Aplidin®)	DÜ	Ascidian <i>Aplidium albicans</i>	PharmaMar (Colmenar Viejo, Madrid, İspanya)	Kanser	Faz II	Faz II	Faz II / III
PM00104 (Zalypsis®)	DÜ Türü	Jorumycin /deniz yaratığı <i>Joruna funebris</i>	PharmaMar (Colmenar Viejo, Madrid, İspanya)	Kanser	-	Faz II	Faz II
DMXBA (GTS-21)	DÜ Türü	Anabesine /solucan <i>Paranemertes peregrina</i>	Comentis (San Francisco, CA, ABD)	Alzheimer	Faz I	Faz II	Faz II
Lurbinctedin (PM01183)	DÜ Türü	Ekteinaskidinler /gömlekli <i>Ecteinascidia turbinata</i> 'dan	PharmaMar (Colmenar Viejo, Madrid, İspanya)	Kanser	-	-	Faz II
CDX-011	DÜ Türü	Dolastatin 10 /deniz tavşanı <i>Dolabella auricularia</i>	Seattle Genetik (Bothell, WA, ABD)	Kanser	-	Faz II	Faz II
SGN -75	DÜ Türü	Dolastatin 10 /deniz tavşanı <i>Dolabella auricularia</i>	Seattle Genetik (Bothell, WA, ABD)	Kanser	-	Faz I	Faz I
PM060184	DÜ	Lithoplocamia lithistoides sünger	PharmaMar (Colmenar Viejo, Madrid, İspanya)	Kanser	-	-	Faz I
Marizomib	DÜ	Salinosporamide A/Deniz aktinomiset <i>Tropik Salinispora</i>	Nereus Farmasötik (San Diego, CA, ABD)	Kanser	-	Faz I	Faz I
ASG-5ME	DÜ Türü	Dolastatin 10 / deniz tavşanı <i>Dolabella auricularia</i>	Astellas (Northbrook, IL, ABD)	Kanser	-	-	Faz I
Bryostatın I	DÜ	Bryozoa <i>Bugula neritina</i>	NCI (Bethesda, MD, ABD)	Kanser Alzheimer	Faz I / II	Faz I / II	Faz I
Soblidotin	DÜ Türü	Dolastatin 10 /deniz tavşanı <i>Dolabella auricularia</i>	Aska İlaç (Tokyo, Japonya)	Kanser	Faz I	Faz III	Durdurulmuş
Synthadotin		Dolastatin 15 / Deniz hare <i>Dolabella auricularia</i>	Genzyme Coporation (Cambridge, MA, ABD)	Kanser	Faz I / II	Faz II	Durdurulmuş
Pseudopterosins	DÜ ve DÜ Türü	Pseudopterosins yumuşak mercan <i>Pseudoptergorgia elisabethae</i>	VimRx İlaç * (Irvine, CA, ABD)	Yara iyileştirici	Faz I	Faz II	Durdurulmuş
Elisidepsin (Irvalec®)	DÜ Türü	Kahalides / Deniz sümküklüböcek <i>Rufescens'in Elysia</i>	PharmaMar (Colmenar Viejo, Madrid, İspanya)	Kanser	-	Faz II	Durdurulmuş
Plinabulin (NPI-2358)	DÜ Türü	Halimide (NPI-2350) / deniz mantarı <i>Aspergillus sp.</i>	Nereus Farmasötik (San Diego, CA, ABD)	Kanser	-	Faz II	Durdurulmuş
Tasidotin (ILX-651)	DÜ Türü	Dolastatin 15 /deniz tavşanı <i>Dolabella auricularia</i>	Genzyme Corporation (Cambridge, MA, ABD)	Kanser	-	Faz II	Durdurulmuş
Hemiasterlin	DÜ	sünger <i>Hemiasterella minör</i>	Eisai (Tokyo, Japonya)	Kanser	-	Faz I	Durdurulmuş
Kahalalid F	DÜ	Deniz sümküklüböcek <i>Rufescens'in Elysia</i> .	PharmaMar (Colmenar Viejo, Madrid, İspanya); Hawaii Üniversitesi (ABD)	Kanser	Faz I / II	Durdurulmuş	-
Skualamin	DÜ	Doğuş köpekbalığı <i>Squalus acanthias</i>	Genaeira * (Plymouth Meeting, PA, USA)	Kanser	Faz I / II	Durdurulmuş	-
HTI-286	DÜ	Hemiasterlin /sünger <i>Hemiasterella minör</i>	Wyeth * (Philadelphia, PA, ABD)	Kanser	Faz I / II	Durdurulmuş	-
Diskodermolid	DÜ	sünger <i>Discodermia dissouta</i>	Novartis (Basel, İsviçre); Harbor Branch (Fort Pierce, FL, ABD)	Kanser	Faz I	Durdurulmuş	-
E7389	DÜ Türü	Halichondria B /sünger <i>Halichondria okadaï</i>	Eisai (Tokyo, Japonya)	Kanser	Faz I	Durdurulmuş	-
Spisulosine (ES-285)	DÜ	Deniz istiridye <i>Spisula polymya</i>	PharmaMar (Colmenar Viejo, Madrid, İspanya)	Kanser	Faz I	Durdurulmuş	-
KRN-7000	DÜ Türü	Agelasphins /sünger <i>Agelas mauritianus</i>	Vrije Universiteit Tıp Merkezi, (Amsterdam, Hollanda)	Kanser	Faz I	Durdurulmuş	-
Æ-941 (Neovastat®)	DÜ karışım	Köpekbalığı kıkırdığı	Æ terna (Québec, Québec, Kanada)	Kanser	Faz II / III	Durdurulmuş	-
NVP-LAQ824	DÜ Türü	Psammalin A /sünger <i>Aplysinella rhax</i>	Dana-Farber Kanser Enstitüsü (Boston, MA, ABD)	Kanser	Faz I	Durdurulmuş	-
Konotoksin G (CGX-1160)	DÜ	Deniz salyangozu <i>konus geographus</i>	Cognetix (Salt Lake City, UT, USA)	Ağrı	Faz I	Durdurulmuş	-
IPL-576092 ve Türüleri	DÜ Türüleri	Contignasterol Sünger <i>Petrosia contignata</i>	Aventis (Strazburg, Fransa)	Anti-astmatik	Faz II	Durdurulmuş	-



Şekil 1.1. Deniz kaynaklarının biyoaktif bileşiklerinin sayısı (12)

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Knidliler= Cnidaria

Knidliler veya Sölenler veya Haşlamlılar, büyük çoğunluğu denizlerde, birkaç türü tatlı sularda yaşayan, doku içeren, taşlara tutunarak yaşayan bir hayvanlar alemi şubesidir. Knidliler çeşitlilik içeren filum olup dünyada 10, 211 (11) tür içeren ve bunun 752 türü Akdenizde bulunmaktadır (12).

2.1.1. Knidlilerin genel özellikleri

1. Yaşam döngüsünde “polip” ve “medüz” olmak üzere iki tip bireye rastlanır.
2. Vücut duvarı diploblastiktir yani epidermis ve gastrodermis tabakalarından ve onların ortasındaki mezogleandan oluşmuştur.
3. Epidermis ve gastrodermis tabakalarının hücrelerinde “nematosit” yakıcı kapsüller olmaktadır. Nematositler özellikle tentaküllerde daha yoğun olarak bulunur.
4. Sinir sistemi sinir ağı şeklindedir ve bazı duyu organları mevcuttur. İmpuls iletimi ise (simmetrik sinaps) her yöne doğrudur.
5. Polipler tomurcuklama yoluyla eşsiz, tüm medüzler ve bazı polipler ise gamet oluşturarak, yani eşeyli çoğalırlar. Eşeyli formlar monoyik ya da diyoik olabilir. Planula larvası görülür. Zigotun bölünmesi holoblastiktir.
6. Kas sistemi, epidermisteki epitel-kas hücrelerinden ve gastrodermisteki salgı (beslenme)-kas hücrelerinden oluşmaktadır. Kas fibrilleri, epitel-kas hücrelerinin kaidesinde uzunlamasına konumlanmışlardır. Beslenme kas hücrelerinde ise bu fibriller dairesel olarak diziliş gösterir. Yüksek organizasyonlu haşlamlılarda ise bu plan değişikliğe uğramıştır ve mezogleada birbirinden bağımsız fibril demetleri uzanmaktadır.
7. Genellikle dallanmış ya da septalar ile bölünmüş olan “gastrovasküler boşluk” hem ağız hem de anüs görevini yapan tek ir deliğe sahiptir. Uzayabilen dokunaçlar ağzın ya da ağız bölgesinin etrafında dairesel olarak dizilidir.
8. Belirgin baş kısmı olmayıp, radyal ya da biradyal simetri gösterirler.

9. Bazı çeşitlerinde ise kitinden, proteinden, ya da kalkerden meydana gelen gelmiş eksoiskelet (dış iskelet) vardır.
10. Boşaltım ve solunum sistemine sahip değiller.
11. Sucul organizmaların çoğunluğu denizlerde ve az kısmı tatlı sularda yaşarlar (13).

2.1.2. Knidlilerin vücut yapıları

Süngerlerde olduğu gibi ergin hayvanlarda da, vejetatif kutup (ağız) ienimal kutup (tepe plakası) arasında uzanan, vücudun larval eksen korunur. Organlar, genellikle ışınsal olarak ve çift sayılarda bu eksen etrafında dizilirler. İki epitel (ekto- ve endoderm) tabakası vücudun büyük kısmını yapar (ekto- ve endoderm terimi en çok bu hayvanlar için kullanılır). Bu iki tabaka arasında bağlayıcı doku görevi yapan mezoglea bulunur. Mezoderm oluşmamıştır. İlk ağız, bağırsak boşluğunun tek açıklığıdır. Bu açıklık erginlerde keza anüs ve eşey bezleri endodermal konumlanmış olanlarda ayrıca eşey açıklık olarak görev yapar. Bağırsak boşluğu sindirimi ve besin maddelerinin dağıtımını sağlar (13).

2.1.3. Ektoderm

Knidlilerin dış epitel kübik, silindir ve nadiren yassı hücrelerden yapılmıştır. Hücrelerin uçları ise ince kutikula ya da siller ile örtülüdür ve ya kamçı taşımaktadır. Ektodermik epitel hücrelerin dip kısımları arasında “intersitital hücreler” görülür. Bu hücreler gelişmenin erken evrelerinde ektoderm ve endodermden köken alır ve knidositleri meydana getirir, eşey hücrelerine değişir, regenerasyon ve tomurcuklanma olaylarında da diğer hücre tiplerini de verebilir. Epitel kas hücreleri epitel hücrelerinin büyük kısmını oluştururlar. Bu hücreler, kaidelerinde kas filamentlerinin olduğu uzantıları ile tanınırlar. Uzantılar ektodermde boyuna, endodermde ise halka kas tabakalarını oluşturur. Yakıcı kapsüller bu şubenin adının vermesine neden olan özelliğidir. Bu mikroskoik hücre organları korunma ve av yakalama zamanında aktifleşirler. Kapsül sıvısı zehir etkisi yaptığı gibi, küçük kabukluların kitin zırhlarını da çözer. Her kapsül ancak bir kere patlayabilir o yüzden yeni kapsüller devamlı oluşmaktadırlar. Ekto- ve endoderm epitel hücreleri arasında yerleşen sinir gangliyonları sinir sistemini oluşturmaktadır. Gangliyonların uzantıları sinir ağlarını oluşturur. Sinir ağları vücudun farklı yerlerinde farklı sıklıktadır. Bunlar polarize olmadıklarından uyarıları her yöne iletirler.

Endoderm (gastrodermis) ikinci epitel tabaka, kübik ya da silindir şeklindeki büyük epitel hücrelerden yapılmıştır. Çok kofullu ve iki kamçılı bu hücreler besin hücreleri olarak bilinir. Epitel hücrelerin uçları sindirilmeyen besin artıkları ile doldurulur.

Mezogleanın yapısı değişik gruplara göre farklıdır. Hidroyit poliplerin bir kısmında hücresiz ve lifsiz bir membrandır “mesolamella” (13).

2.1.4. Döl değişimi

Knidlilerin çoğunda, sabit olan polip ve serbest yüzen medüz tipleri, aynı türün iki ayrı dölü halinde birbiriyle ardışık olarak değişerek sürdürülür. Polipler, vejetatif (eşaysız) olarak, tomurcuklanmaya da bölünme ile medüzleri üretirler. Medüzler ise yumurtla üretirler, döllenmiş bu yumurtalardan biri planula larvası ve ondan da polip meydana gelir. Polipler doğrudan doğruya polipleri ya da eşey hücrelerini meydana getirirler. Medüzlerin yumurtalarından yine medüzler oluşur (13).

2.1.5. Polip

Silindirik vücut yapısına sahip, kaidesindeki pedisel disk veya kök şeklindeki bir sap ile yere oturarak sabit yaşarlar. Koloni halinde yaşayanlarda polip formlar morfoljik bakımdan farklı tipleri oluşturur. Bunların kolonilerindeki gövdeleri farklıdır. Genellikle,

- Hydrozoa poliplerinde:
- Gastrozoid (Beslenme polibi)
- Gonozoid (Üreme polibi)
- Dactylozoid (Tentaculozoid) (Korunma polibi)
- Anthozoa poliplerinde:
- Authozoid (beslenme ve üreme polibi)
- Siphonozoid (Su akımı polibi) olarak görülür (13).

2.1.6. Medüzler

Vücut çan veya şemsiye şeklindedir. Çevresinde tentaküller bulunan vücudun büyük kısmını mezoglea tabakası oluşturur. Knidlilerin sinir sistemleri merkezileşmiş ve ağ

şeklindedir. Genellikle ağzın bulunduğu uçta ağız çevresinde halka şeklinde dizilmiş tentakülleri bulunur. Besin olarak, su içindeki besin parçacıkları ile ya da tuzağa düşürüp yakaladıkları hayvanlar ile beslenirler. Karnivor hayvanlardır. Tentaküllerini av yakalamada kullanırlar. Knidililerde tek boşluk olan sölenteron aynı zamanda sindirim kanalıdır. Su düzenlenmesi ve boşaltımında özelleşmiş organları yoktur, çoğu stenohalindir (13).

2.1.7. Hareket

Özel hareket organelleri yoktur. Bununla beraber, su içinde pasif yüzme ya da takla atma hareketleri görülebilir. Özel solunum organları yoktur. Başlıca duyu organları, tentakülleri kaidesinde veya vücudun kenarlarında bulunan basit gözler veya denge organıdır (13).

2.1.8. Ekolojileri ve yaşam tarzları

Knidililer büyük ölçüde deniz canlılarıdır. Sahillerden büyük derinliklere kadar her tarafta bulunurlar, ancak pek az kısmı tatlı sularda soliter yaşayan poliplerdir; pek az kısmı da tatlı su medüzleridir. Acı ve çorak sularda ise ancak özel bazı türleri barındırırlar; bunlar topuz polipleri olarak bilinen Cordylophora ve Moerisiidae'dir. Polypodium türleri tatlı sularda parazit olarak yaşarlar.

Polipler, suların taban kısmında (bentik) ya da bitki zonlarında (Phytal) tutunarak yaşarlar. Medüzler ise serbest su ortamlarında yaşayan canlılardır. Bazı polipler pelajik yaşadıkları için tentakülleri yüzme organı olarak görev yapar. Bazı medüzler tabanlarda ve bitkilerin üzerinde sürünerek ya da deniz kumlarının kum tanecikleri arasında yüzerek yaşarlar. Birçok medüzün ve Siphonophora'nın tentakülleri arasında balık yavruları yaşar. Haşamlılar etçil hayvanlardır; çoğu avlarını tentakülleriyle yakalar. Avları, haşamlıların büyüklüklerine göre plaktondan balıklara kadar uzanır. Bazı Anthozoa türlerinde ektodermin silli alanları besin alımında önemli rol oynar. Siller gövdeye yaklaşan besin parçacıklarına vurularak ağıza doğru yönelendirilir. Tentakülleri ya da manubriyumları ile yakaladıkları avlarını knidosistleri ile uyuşturduktan ve öldürdükten sonra yutarlar. Vücutları çok fazla genişleyebildiklerinden çok büyük hayvanları yutabilirler. Sindirimleri kısmen hücre içinde, kısmen de hücre dışındadır.

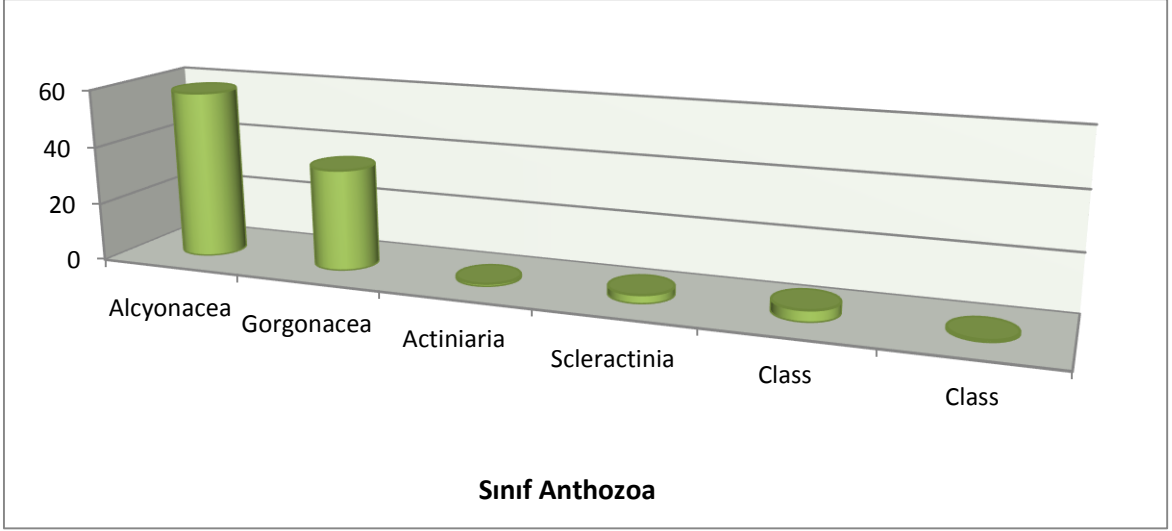
Knidlilerin hareket yetenekleri sınırlıdır. Poliplerin çoğu buldukları yere sıkıca bağlanmıştır. Yerini değiştiren formlar, çok çeşitli hareket şekilleri gösterirler. Hydra ve bazı aktiniyalar takla atar gibi yani üst kısımlarını alta, kaidelerini yukarıya getirmek suretiyle hareket edebilirler (13).

2.1.9. Sistematiği

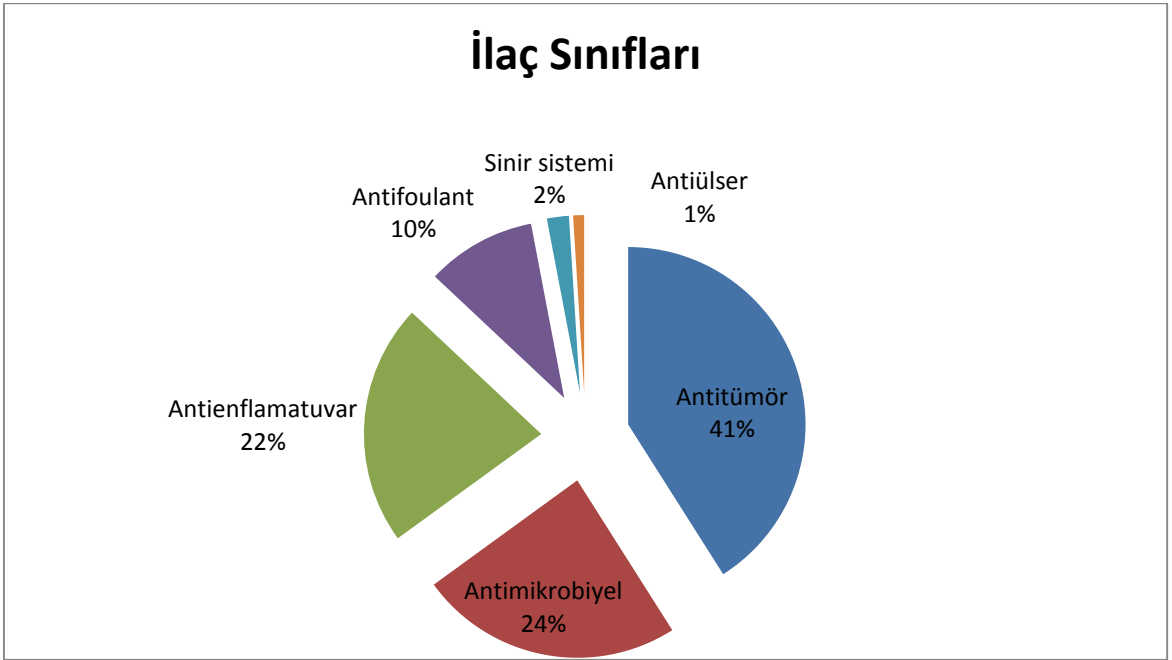
Çizelge 2.1.Knidliler Sınıfları

Sınıf	Alt sınıf	Takım
Hydrozoa (≈ 3500)		Hydroida
		Trachylina
		Siphonophora
Scyphozora (≈ 200)		Lucernariida
		Carybdeida
		Coronata
		Semaeostomaeae
		Rhizostomeae
Anthozoa (≈ 7500)	Octocorallia	Alcyonaria
		Gorgonaria
		Pennatularia
	Hexacorallia	Actiniaria
		Madreporaria
		Zoantharia
		Antipatharia
		Ceriantharia

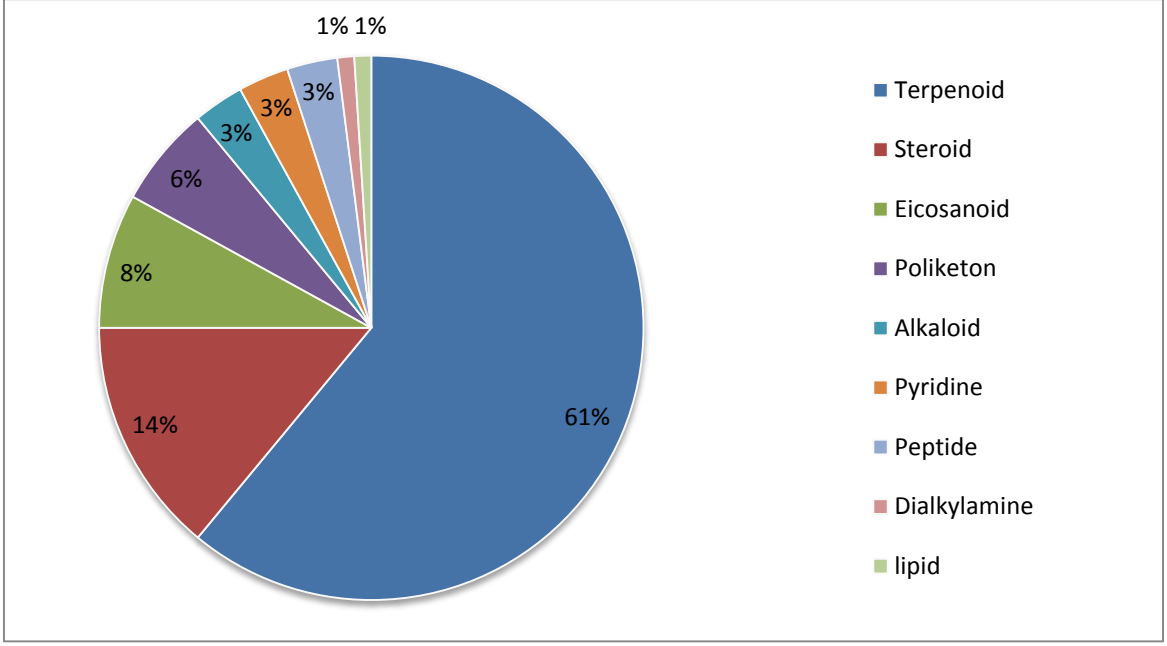
Taksonomik olarak gruplandırılmış olan Knidliler türleri bize hangi türlerin yeni tedaviler için potansiyel oluşturduğunu bilmek açısından önemli yere sahiptir. Knidliler tür tayini en zor olan işlerden biri olup literatürde geçen bazı kaynaklar da doğru olmayabilir (14). Knidliler grupları yüksek biyoteknolojik öneme sahip deniz canlılarından biridir. Knidliler alt sınıfı olan Anthozoa'nın en çok üzerinde çalışılan alt sınıfının başında gelmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmaların sonucunda Knidlilerin yüksek biyoteknolojik öneme sahip biyoaktif sekonder metabolitler ve biyolojik aktiviteleri Şekil 2.1, 2.2, ve 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.1. Knidlilerin en çok çalışılan altgrupları (5)



Şekil 2.2. Son on senede çalışılan filum Knidliler'nin yüksek biyoteknolojik öneme sahip biyoaktif sekonder metabolitler ilaç sınıfları (5)



Şekil 2.3. Son on senede çalışılan filum Knidliler'nin yüksek biyoteknolojik öneme sahip biyoaktif bileşikleri (15)

2.2. SINIF: ANTHOZOA (MERCANLAR)

Bu sınıfta 7,500 tür mevcuttur, bu da Knidliler türünün üçte ikisi demektir ve sınıfın ismi "anthos" çiçek, "zoon" hayvan kelimelerinden oluşmuştur. Anthozoa ya da Mercanlar, omurgasız hayvanların Knidliler şubesinin denizlerde yaşayan bir sınıfıdır. Yumuşak mercanlar, boynuzsu mercanlar, dikenli mercanlar, gerçek mercanlar gibi çeşitleri vardır. Deniz şakayıkları da bu sınıftandır. Bu sınıfın hidrzon ve skifozoonlardan farkı medüz döllерinin bulunmamasıdır. Septumlara sahip olmalarına rağmen septal hunisi yoktur. Vücutleri altı, sekiz ve ya çok ışınlı biradyal gösterirler. Oral uçları yassı plakaya benzer. Ağız plakasının etrafında dizilmiş pinüllü ya da düz tentaküller bulunur. Oval ve ya uzun bir yarık şeklindeki ağız kısa bir yemek borusuna "stomodeum"a açılır. Ağızın kenarlarının birinden ya da her ikisinden uzun kirpikli bir oluk "siphonoglyph" ya da "sulcus" uzanır. Olukların görevi kirpiklerin devamlı çarpma hareketleri ile solunumu sağlamak üzere gastrovasküler boşluğa doğru devamlı su akımı meydana getirmektir.

Antazoon poliplerinde gastral boşluk, ortada bir mide kısmı ile bunun etrafında sıralanan gastral odacıklardan oluşmuştur ve septumlar aracılığıyla bir birlerinden ayrılmışlardır.

Antazonların vücut çeperlerine ait olan kaslar değişik derecelerde gelişmiş olan, ektodermik boyuna kaslarla endodermik transversal kaslardan oluşmuştur. Duyu organları bulunmamaktadır.

Polip vücutlu bu canlıların mineral maddelerinden karışmış boynuzsu iskeletlerine de mercan denir. Mercan iskeletlerinin binlerce yıl boyunca belli bir bölgede toplanması sonucunda da, mercan kayalıkları meydana gelir. Yalnız veya koloniler halinde yaşarlar. Vücutları ışınsal simetridir. Ağız çevrelerinde uzantılı dokunaçları vardır. Ağız ve kolları kaslarla açılıp kapanabilir. Küçük canlılarla beslenirler. İskeletleri dış derilerinin salgısından meydana gelir.

Akdeniz, Kızıldeniz gibi sıcak deniz diplerinde bulunan büyük taşlara yapışık olarak yaşarlar. Pek nadir olarak serbest yüzenlerine de rastlanır. Her bir mercan veya mercan ünitesi kalkerli bir kabuk içinde birbirine sıkı sıkı bağlanmış mercan hayvancıkları ihtiva eder. Mercanın vücudu sütun şeklindedir. Bu sütunun üstünde, kavrama uzuvlarını ve merkezi ağız taşıyan düz bir disk bulunmaktadır. Mercan, kabuğun içinde belli bir miktarda büzülebilir, ancak kabuğu terk edemez. Koloni fertlerinin kabukları birbirinden değişik şekillerdedir. Kalkerden meydana gelen kabuk kütlesi, sürgün şeklindeki üreme sonucu devamlı olarak büyür. Bu büyüme sırasında sadece kütlenin yüzeyindeki mercanlar canlı olarak kalır.

Hem eşeyli, hem de bölünme veya tomurcuklanma ile eşeysiz çoğalırlar. Eşeysiz olarak üreyenler ana koloniye bağlı kalırlar. Çoğu ayrı eşeylidir. Üreme hücrelerinin döllenmesi ana hayvanın içinde veya suda serbest olarak olur. Döllenme sonucu meydana gelen kirpikli larva küçük bir kurtçuğa benzer. Kirpikleriyle bir müddet serbest yüzdükten sonra kendini bir kayaya tespit eder. Gelişimini tamamlayarak polip haline gelir ve kalkerli bir iskelet salgılar. Tomurcuklanma ile üreyerek yeni polipler meydana getirir. Koloninin salgıladığı iskeletler yığın halini alarak, mercanlar hareket edemez olur.

Antazonların hepsi deniz hayvanları olup soliter ve ya koloni halinde yaşarlar. Çoğunluğu sesildir. Nadiren tekli yüzenleri de bulunur. Genellikle sıcak bölgeleri tercih etmektedirler ve kaynaşan mercanlariskeletleri ile boyları 3 metreye kadar değişen setler ve resifler oluştururlar. Bazen de halka şeklini alarak ortası deniz olan adalar meydana getirirler. Bunlara da atol denir. Norveç batı sahillerinde olduğu gibi soğuk iklim bölgelerinde de

mercan kayalıklarına rastlanmaktaysa da, mercan kayalıklarının en çok bulunduğu yerler; Afrika'nın doğu sahillerinden Büyük Okyanusdaki Hawaii Adaları arasındaki bölge ile Bermuda'dan Brezilya'ya kadar olan bölgelerdir. Akdeniz'de de çalı veya ağaç biçimli koloniler halinde, 200 metrelik derinlerde bulunurlar.

Antazoonlar 10-100 yıl arası yaşarlar. Örnekleri %70 derecelik alkolde, magnezyum sülfat, metanol ve uretan ile felç edilerek gerilmeleri sağlanır ya da kuru saklanır (13).

Genellikler mercanlar sert mercanlar ve yumuşak mercanlar diye ikiye ayrılırlar. Sert mercanlar yaklaşık 1500 tür mercanı, yumuşak mercan ise 3000 tür içerdiği bilinmektedir. Son 20 senede, yaklaşık 3000 yeni bileşik izole edilmiştir (15). Mercanların çoğu ise araştırılmayı beklemektedir. Çünkü son 20 senede, mercanların sadece %3'ü araştırılabilmektedir (16).

2.2.1. Biyolojik Aktiviteler

Deniz Omurgasızları dünyanın en çeşitli gruplarının birisidir. Deniz omurgasızları 11,000 tür içerir, bunların 7,500'i Anthozoa sınıfına aittir (15). Knidliler grupları ve sınıfları sekonder metabolitlerce zengindir. Sekonder metabolitlerde bir organizmaya veya genetik olarak yakın organizmaya ait olup her organizma için de değişken göstermektedir (17). Sekonder metabolitler içerdiği zengin bileşikleriyle yüz yıllardır terapötik ajan olmaya devam etmiştir (18). Knidlilerden izole edilen terapötik amaçlı biyoaktif bileşikler geleceğimiz için önemli yer teşkil etmektedir. Bu bileşiklerin içinde antitümör aktivite gösteren bileşikler daha da ilgi çekici hale gelmiştir. Knidlilerin antitümör etki göstermesinin ana nedenlerinin birisi yapısında terpenleri (Monoterpenler, diterpenoller, seskiterpenler) içermesinden kaynaklanmaktadır (15). Bu nedenle Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) Knidliler cinsinin kanser tedavisi için önemli bir kaynak olduğunu ortaya koydular. Antikanser etkisine sebep olan terpen gruplarının yanısıra, Knidliler türlerinden bu zamana kadar indol alkaloidler, fenolik bileşikler, terpenoidler, terpenler vb bileşikler izole edilmiştir ve bu sekonder metabolitler, anti-HIV sitotoksik, anti-inflamatuar, antikanser, antimikrobiyal ve kardiovasküler sisteme etkilidir. Aşağıda belirtmiş olduğumuz biyoaktif bileşiklerin izole edildiği Knidliler türlerinin %84'ü tropik sulardan (Karayip denizi ve diğer) ve %16'sı ise ılıman sulardan (Japonya, Avrupa ülkeleri) elde edilmiştir (15). Knidliler türlerinin bileşikleri ve onların biyolojik aktiviteleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Knidliler türlerinin bileşikleri ve onların biyoaktiviteleri (5)

Familiya ve tür	İlaç sınıfı	Birleşik	Kimyası	Ülke	Ref
Alcyoniidae					
<i>Klyxum simplex</i>	Antienflamatuvar	SimleksinE	Diterpenoit	TAIW	(5)
<i>Klyxum simplex</i>	Lobophyllum sp.	Klisimpleksin B ve H	Diterpenoit	TAIW	
<i>Lobophyllum sp.</i>	Antitümör	Lobofiten	Diterpenoit	VN	
<i>Lobophyllum sp.</i>	Anti-HIV	Lobohedleolit	Diterpenoit	PHL	
<i>Lobophyllum sp.</i>	Anti-HIV	(7Z)-lobohedleolit	Diterpenoit	PHL	
<i>Lobophyllum sp.</i>	Anti-HIV	17 dimetilamino lobohedleolit	Diterpenoit	PHL	
<i>Lobophyllum crassum</i>	Antienflamatuvar	Krassumolit A ve C	Terpenoit	TAIW	
<i>Lobophyllum cristagalli</i>	Antitümör	Kembranolit diterpen	Diterpenoit	RSC	
<i>Lobophyllum durum</i>	Antienflamatuvar	Durumolitler A-C	Terpenoit	TAIW	
<i>Lobophyllum durum</i>	Antienflamatuvar	Durumhemiketalolit A-C	Kembranoit	TAIW	
<i>Sarcophyton trocheliophorum</i>	Sitotoksiste	99,11-sekosteroit	Sterol	CHIN	
<i>Sarcophyton crassocaule</i>	Antitumor	KrassokolitH-M	Kembranoit	TAIW	
<i>Simularia sp.</i>	Antitülsler	Simulit	Spermin		
<i>Simularia sp.</i>	Antimikrobiyal	Lipitler	Poliketit	RUS	
<i>Simularia flexibilis</i>	Antitümör	Fleksilarin D	Kembranoit	TAIW	
<i>Simularia flexibilis</i>	Antifoulant	11-episulariolit	Diterpenoit	AUS	
<i>Simularia flexibilis</i>	Sitotoksiste	11-asetoksi-7a-hidroksi-krassarosterol	Sterol	CHIN	
<i>Simularia gibberosa</i>	Sitotoksiste	gibberodion	Terpenoit	CHIN	
<i>Simularia gibberosa</i>	Antienflamatuvar	Gibberoketosterol	Sterol	TAIW	
<i>Simularia querciformis</i>	Antienflamatuvar	Kuersiformolit C	Terpenoit	TAIW	
Clavariidae					
<i>Clavaria sp.</i>	Sinir sistemi	Stolonidol	Diterpenoit	JPN	
<i>Clavaria koellikeri</i>	Antitümör	Kembrane tip	Diterpenoit	JPN	
<i>Clavaria viridis</i>	Antitümör	Klaviridik asit	Prostanoit	TAIW	
<i>Clavaria viridis</i>	Antitümör	Klavulon	Prostanoit	TAIW	
<i>Clavaria viridis</i>	Antitümör	Klaviridenon	Prostanoit	TAIW	
<i>Clavaria viridis</i>	Antitümör	Halojenli prostanoitler	Prostanoit	JPN	
<i>Clavaria viridis</i>	Antitümör	Bromovulon III	Prostanoit	TAIW	
<i>Clavaria viridis</i>	Antitümör	Yonarasteroller	Sterol	JPN	
<i>Clavaria viridis</i>	Antitümör	Stoloniferon E	Sterol	TAIW	
<i>Teleso risei</i>	Antitümör	Punaglandins	Prostaglandin	USA	
Nephthidae					
<i>Dendronephthya sp.</i>	Antifoulant	Isogosterones A-D	Sterol	JPN	
<i>Dendronephthya rubecola</i>	Antitümör	Kapnell-9 (12)-ene-8β,10α-diol	Sesquiterpenoit	DE	
<i>Nephtea chabroli</i>	Antitümör	Şabranol	Terpenoit	TAIW	
<i>Nephtea erecta</i>	Antienflamatuvar	Ergostanoitler 1 ve 3	Ergostanoit	TAIW	
Xeniidae					
<i>Asterospicularia laurae</i>	Antitümör	Asterolaurin A	Diterpenoit	TAIW	
<i>Cespitularia hypotentaculata</i>	Antitümör	Cespitularin C	Diterpenoit	TAIW	
<i>Xenia novaebritanniae</i>	Antibakteriyel	Kseniolit I	Diterpenoit	ISR	
<i>Xenia plicata</i>	Antitümör	Blumiolit C	Diterpenoit	TAIW	
Familiya ve tür	İlaç sınıfı	Birleşik	Kimyası	Ülke	Ref
Briareidae					
<i>Briareum Kazı</i>	Antienflamatuvar	Briaeksavatin E	Diterpenoit	TAIW	
<i>Briareum Kazı</i>	Antitümör	Briaeksavatulit L and P	Diterpenoit	TAIW	
<i>Briareum asbestinum</i>	Antimalarial	Briarellin D, K and L	Diterpenoit	PAN,	
Ellisellidae					
<i>Junceella fragilis</i>	Antienflamatuvar	Frajunolit B and C	Terpenoit	TAIW	
<i>Junceella juncea</i>	Antifoulant	Juncin ZII	Diterpenoit	TAIW	
Gorgoniidae					
<i>Leptogorgia setacea</i>	Antifoulant	Homarin	Piridin	GEO	
<i>Leptogorgia virgulata</i>	Antifoulant	Homarin	Piridin	GEO	
<i>Leptogorgia virgulata</i>	Antifoulant	Pukalit	Diterpenoit	ABD	
<i>Leptogorgia virgulata</i>	Antifoulant	Epokspukalit	Diterpenoit	ABD	
<i>Pseudopterogorgia sp.</i>	Antitümör	Sekosteroller	Sterol	ABD	
<i>Pseudopterogorgia sp.</i>	Antienflamatuvar	Sekosteroller	Sterol	ABD	
<i>Pseudopterogorgia acerosa</i>	Antitümör	Bis (pseudopterane) amin	Dialkilamin	BHS	
<i>Pseudopterogorgia bipinnata</i>	Antitüberküloz	Bipinapterolit B	Terpenoit	ABD	
<i>Pseudopterogorgia bipinnata</i>	Antimalarial	Kaucanolit A and D	Diterpenoit	ABD	
<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i>	Antimikrobiyal	Pseudopterolin X	Diterpenoit	ABD	
<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i>	Antitüberküloz	Ileabethoksazol	Diterpenoit	ABD	
<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i>	Antitüberküloz	Homopseudopteroksazole	Diterpenoit	ABD	
<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i>	Antitüberküloz	Karibenol A and B	Terpenoit	ABD	
<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i>	Antitüberküloz	Elisapterosin B	Diterpenoit	ABD	
<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i>	Antimalarial	Aberrarone	Diterpenoit	COL	
<i>Pseudopterogorgia kallos</i>	Antimalarial	Bielschowskysin	Diterpenoit	PAN	
<i>Pseudopterogorgia kallos</i>	Antitümör	Bielschowskysin	Diterpenoit	PAN	
<i>Pseudopterogorgia rigida</i>	Antimikrobiyal	Kurkufenol	Terpenoit	ABD	
<i>Isis hippuris</i>	Antitümör	Suberosenol B	Terpenoit	TAIW	
<i>Isis hippuris</i>	Antitümör	Polyoksigenate steroidler	Sterol	HIND	
<i>Isis hippuris</i>	Antitümör	A -nor-hippuristanol	Sterol	TAIW	
<i>Isis hippuris</i>	Antitümör	İşişifurik asit B	Sterol	TAIW	
Plexauridae					
<i>Eunicea sp.</i>	Antimalarial	Seskiterpenoidler	Seskiterpenoit	ABD	
<i>Eunicea fusca</i>	Antienflamatuvar	Fuskisitler	Diterpenoit	ABD	
<i>Euplexaura flava</i>	Antienflamatuvar	Butenolit	Lipit	JPN	
<i>Eunicella cavolini</i>	Antiproliferatif	99,11-sekosteroit	Sterol	GREECE	
Medusozoa					
<i>Stomolophus Meleagris</i>	Antioksidan	nematoksist protein SmP90	protein	CHINA	
<i>Carijoa riseia</i>	Antiproliferatif	punaglandinler	Yağ asit	ABD	
<i>Zoanthus Sp.</i>	Sitotoksiste	Norzoantaminon	Alkaloit	JPN	
<i>Zoanthus Sp.</i>	Sitotoksiste	Oksizoantamin	Alkaloit	JPN	
<i>Zoanthus Sp.</i>	Sitotoksiste	Siklozoantamin	Alkaloit	JPN	
<i>Zoanthus Sp.</i>	Sitotoksiste	Epinozoantamin	Alkaloit	JPN	

2.2.2. Diğer Knidliler Sekonder Metabolitleri ve Aktiviteleri

2.2.2.1. Palitoksin

Palitoksin (PLTX), *Palythoazoanthids* ve *Ostreopsis dinoflagellates* türlerinde bulunup, aynı zamanda yengeçlerde ve balıklarda da bulunmaktadır. Palytoxin cilt tümör promoteri olup birçok karsinogenez sinyal mekanizmasını bloklamak için kullanılır. Aşamalı fare cilt modeli bize tümör erken, uzatmalı ve ters faz karsinogenezini gösterir. Tümör promotör moleküler mekanizmasının açıklığa kavuşması kanser tedavilerine strateji geliştirmek açısından çok önemlidir (19).

2.2.2.2. Prostaglandinler

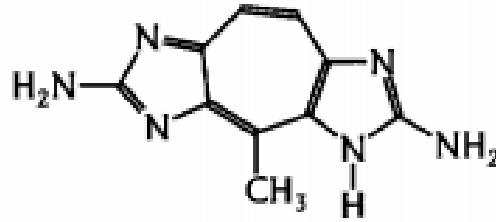
Prostaglandinler, lipid sınıfına ait olup farmakolojik olarak çok büyük öneme sahiptir. Bu bileşikler prostanoik asitlerin türevidir. Prostaglandin yapısı ilk olarak 1962'de aydınlatılmış olup ve bu yapının prostatta sentezlendiğine inanılmaktaydı (20). Han ve ark. (2006), paclitaxel benzeri nevrit-dejenere bileşiklerini ararken Okinowa Knidliler cinsi olan zoantit *Palythoa kochii*'den PGA2 ve PGB2 prostaglandinlerini doğal ürünlerden hücre bazlı tahlil yöntemiyle izole etmişlerdir. PGA2 aktivitesi Paclitaxel (Taxol) ve epothilone'ne benzemekte olup ancak PGA2 Paclitaxel kadar etkili olmamasına rağmen tübilini uyarmıştır (21).

2.2.2.3. Lipidik a-Amino Asitler

Lipidik a-Amino Asitler (LAA), uzun doymuş bağlarıyla ve doymamış alifatik zincirleriyle doğal olmayan amino asitler olarak adlandırılmışlardır. Wilke ve ark. (2010), deniz ürünlerinden Antikanser bileşikler ararken zoantid *Protopythoa variabilis*'den iki sitotoksik lipidik amino asit karışımını elde etmişlerdir. 14 sentetik ve 2 doğal lipidik amino asitlerin antiproliferatif potansiyelleri 4 tümör hücreleri (HCT-8, SF-295, MD-MB-435 ve HL-60) üzerinde değerlendirilmiştir (22). 5 sentetik lipidik amino asitleri yüksek yüzdede tümör hücre durdurmasına sebep olurken, doğal LAA'lar tümör hücre büyümesini tamamen durdurmuştur. Aynı zamanda LAA HL-60 hücre çizgisi apoptoz etkileri de incelenmiştir. Uygulanan hücreler mitokondriyel potansiyel kaybı ve DNA fragmentasyonu göstermiştir (22).

2.2.2.4. Zoantoksantinler

Zoantoksantin alkaloitleri sarı floresan renk veren maddeler olup ana familyası Zoanthidea olan kolonlar halindeki anthazoalardan yayılırlar. Onların molekülleri 3 iskelet yapısı arasında değişim göstermektedir; 3H-zoanthoxanthin, 3H-pseudozoanthoxanthin ve +H-pseudozoantoakstin (23). Turk ve ark. (1995), zoanthid mercan *Parazoanthus axinella*'dan etanol ekstresinden elde etmiştir. Etanol ekstresi fare ve yengece ölümcüldür ve antikolinesteraz aktivite göstermiştir. Birkaç Antikolinesteraz inhibitörlerinin izolasyonu tarzı faz YSBK yardımıyla yapılmıştır. Alkaloit olan Parazoanthoxanthin A pigmenti Antikolinesteraz aktivite gösteren izole bileşiktir (26).



Şekil 2.4. Parazoantoksantin A

2.2.2.5. Zoantaminler

Zoanthamin alkaloitleri ilk olarak 20 sene önce Hindistan Visakhapatnam'dan toplanan zoanthid *Zoanthus* sp.'den izole edilmiştir. Uemura ve ark. (1995), Güney Japonyadan toplanan *Zoanthus* türlerinden 5 yeni zoanthamin doğal ürünleri izole etmiştir. Onlar; Norzoanthamine, Norzoanthaminone, Oxyzoanthamine, Cyclozoanthamine ve Epinorzoanthamine bileşikleridir. Çalışmayı yapanlar Norzoanthamine ve Cyclozoanthamine bileşiklerinin P38 lösemi hücrelerine önemli derece sitotoksikite gösterdiğini bildirmişlerdir. Norzoanthamine aynı zamanda gelecek vaat eden IL-6 ostroporetik ilaç adayı olarak da belirlenmiştir (27).

Çizelge 2.3. P388 Lösemi sitotoksikite değerleri (27)

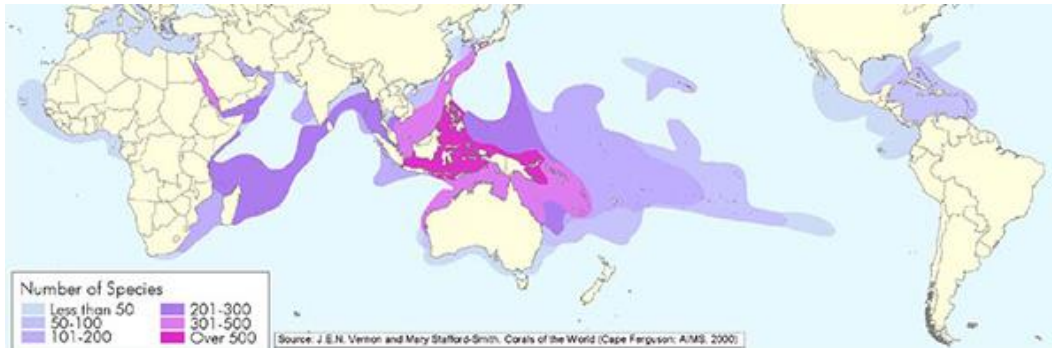
Bileşik	P388 Murine lösemi kanseri durdurucu IC ₅₀ değerleri (µg/mL)
Norzoantamin	24,0
Norzoantaminon	1,0
Oxyzoantamin	7,0
Cyclozoantamin	24,0
Epinorzoantamin	2,6

2.2.2.6. *Chromonephtea braziliensis*

Chromonephtea braziliensis'in farklı solvanlar ile hazırlanan ekstrelerin sitotoksisite ve mutagenesite ama genotoksisite aktivitelerine bakılmıştır. Çalışma sonunda, n-Hex, DCM, EtOAc ve MeOH ekstrelerinin sitotoksisite ve mutagenesite ama genotoksisite aktivitesi bulunamamıştır ve DCM, EtOAc ve MeOH ekstrelerinin genotoksisite aktivite göstermiştir, fakat DNA hasarı gözlenmemiştir. Genetik toksisite, genotoksinlerin kromozom ve DNA yapısında meydana getirdiği hasarları kapsayan bir terimdir. Bu hasarlar genellikle gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, DNA zincir kırıkları ve DNA eklentileridir. Bu tip genetik hasarlar; doğum defektleri, kanser, yaşlanma, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoryal hastalıklara yol açabildiği için, mutajen ve karsinojenlerin tanımlanması ve risklerinin en düşük seviyeye indirilebilmesi halk sağlığının korunması için önemlidir. Bu türden izole alkaloit olan 23-ketosikladiellin-A bileşiğinin de anti-feedant özelliği bulunmaktadır (28).

2.2.3. Dünya Üzerinde Yayılış

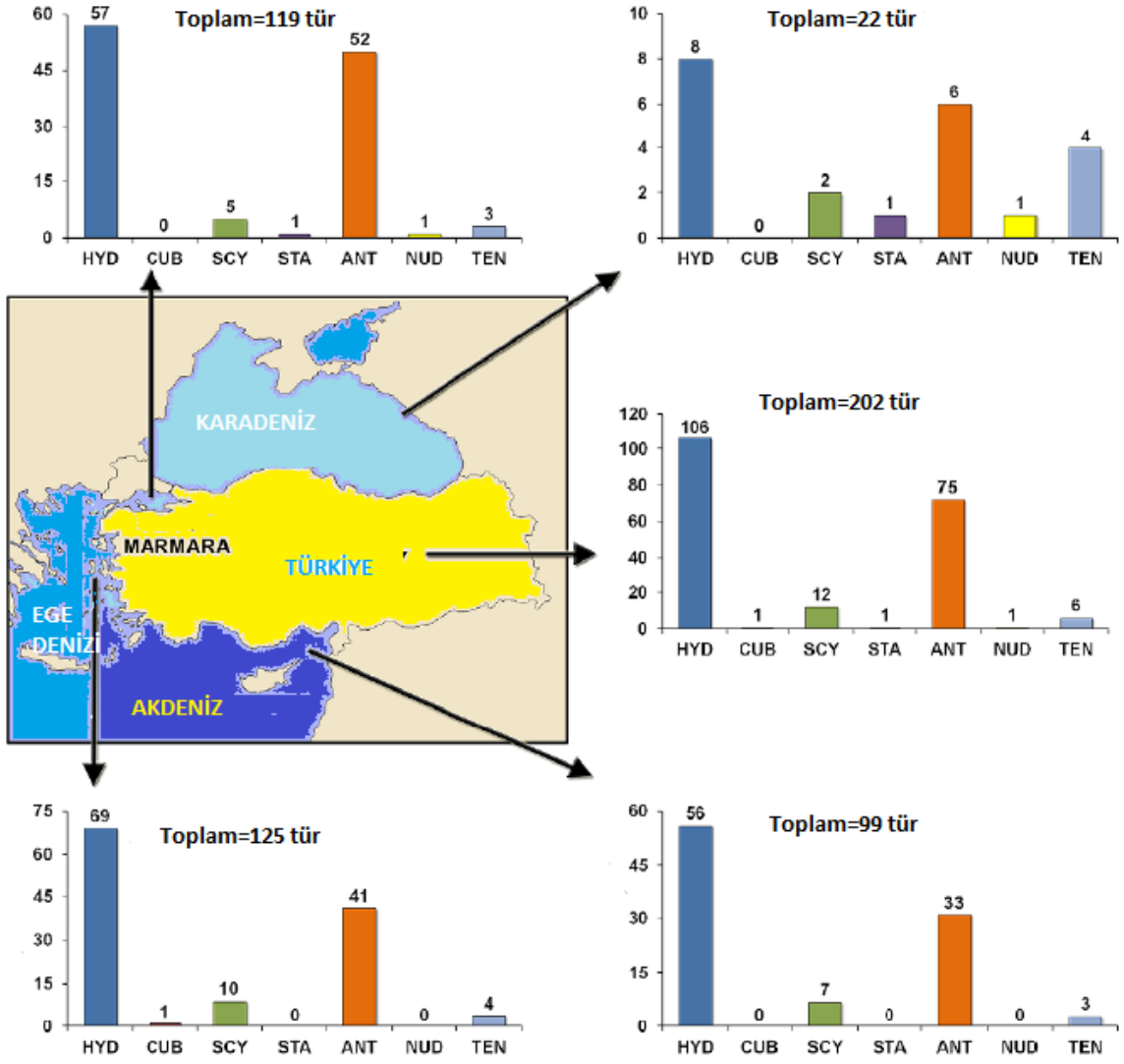
Knidliler türleri, Adriyatik, Akdeniz, Ege, Avustralya, Yeni Zelanda, Afrika kıyılarında ve Amerika kıtaları kıyılarında yayılış gösterirler.



Şekil 2.5. Knidliler türlerinin dünya üzerindeki yayılışı (<http://marinebio.org/>)

2.2.4. Türkiye Denizlerinde bulunan Knidliler türleri

Türkiyede Knidliler türleri Türkiye Karadeniz, Akdeniz, Marmara denizi ve Ege denizi kıyılarında yaşamaktadır. Toplam 195 Knidliler 5 sınıfa (Hydrozoa, Cubozoa, Scyphozoa, Staurozoa, and Anthozoa) ait türleri tespit edilmiştir. Bunların daha çok bulunanları 121'i Ege denizinde ve 17'si ise Karadeniz kıyılarında bulunduğu belirlenmiştir (29). Yakın zamanda 16 farklı ve yeni Knidliler türleri tespit edilmiştir. Aşağıda Şekil 2.6 ve 2.7'de belirtilmiştir.



Şekil 2.6. Türkiye Knidililer türlerinin bulunduğu Denizlere göre Knidililer sayıları (29)



Şekil 2.7. Türkiye kıyılarının yeni anthozoa türlerinin bulunduğu harita (29)

Tezin konusunu teşkil eden *Paramuricea clavata* Mercanların alt sınıflarındandır. Genel özellikleri altta verilmiştir;

2.2.5. *Paramuricea clavata*

Paramuricea clavata, morumsu yelpaze mercanı, Plexauridae ailesinin yumuşak mercan türüdür. Kuzeydoğu Atlantik Okyanusu ve kuzeybatı Akdeniz'de sığ denizlerde bulunur. Bu tür 1826 yılında ilk Fransız doğa bilimci Antoine Risso tarafından bulundu ve incelendi (30).

2.2.5.1. Vücut yapıları

Paramuricea clavata tek bir düzlemde bir yelpaze şeklinde koloni oluşturan dallanan bir yapıya sahiptir. Kök ve dalları azgın iskeleti üreten karmaşık bir protein gorgonyan tarafından oluşturulur. Coenenchyme, hücrelerden oluşan ince bir tabaka iskeleti kapsar ve polipler bunlardan çıkar. Bu çıkıntılarının her biri sekiz besleme dokunaçlar ile merkezi ağzı çevreliyorlar. Poliplerin yüksekliği 10 mm kadar ve tüm koloninin yüksekliği ve eni bir metreye kadar vardır. Renk genellikle kırmızı, ancak kısmen sarı olabilir (30).

2.2.5.2. Dağılım ve habitat

Doğu Atlantik Okyanusu'nda İspanya ve Portekiz'in kıyılarına ve Batı Akdeniz *Paramuricea clavata*'nın doğal mekanıdır. *Paramuricea clavata* tabanı 10 ve 100 m (33 ve 328 ft) arasındaki derinliklerde tortu gömülü şekilde kayalık üzerinde büyür. *Paramuricea*

clavata suyun akışını, sedimentasyon oranlarını ve besinlerin dağılımını değiştirdiği gibi çevresinde pek çok organizma etkileyen bir ekosistem mühendisi olarak kabul edilir (30).

2.2.5.3. Biyolojisi

Paramuricea clavata süzerek beslenenlerdendir, çünkü dokunaçlarını uzanan polipler geri yüzen besin parçacıkları yakalarlar ve öyle beslenirler. Besin öğeleri kopepodları, diatomları, dinoflagellatları siliyatları ve organik karbon parçacıkları kapsamaktadır.

Koloniler erkek veya kadın kolonilelerini oluşturmaktadır. Sperm erkek koloniler tarafından denize serbest bırakılır ve döllenme kadın kolonilerin yüzeyinde meydana gelir. Planula larva olarak su kolonuna serbest bırakılmadan önce embriyolar öncelikle oraya damızlanırlar. Larvalar ışıktan ürkerler ve deniz tabanına yerleşirler. Orda onlar polip haline döndürülür ve iskelet oluşturmak için gorgonin salgılamaya başlar. Koloninin daha da büyümesi yeni poliplerin tomurcuklanmasını gerektirir. Bazı yeni koloniler mevcut kolonilerin parçalarından oluşabilir. *Paramuricea clavata* yavaş büyüyen tür ve koloniler muhtemelen yaklaşık elli yıl yaşayabiliyorlar (30).

2.2.5.4. Morfolojik ve Anatomik Özellikleri

2.2.5.4.1. Sistematikteki Yeri

Alem	: Hayvanlar Alemi	Takım	: Plexauridae
Alt Alem	: Knidliler	Aile	: Paramuricea
Şube	: Mercanlar	Cins	: Paramuricea
Alt Şube	: Octocorallia	Tür Adı	: <i>P. clavata</i>
Sınıf	: Alcyonaria	Bilimsel Adı	: <i>Paramuricea clavata</i>
Alt Sınıf	: Holaxonia	Diğer Adları	:

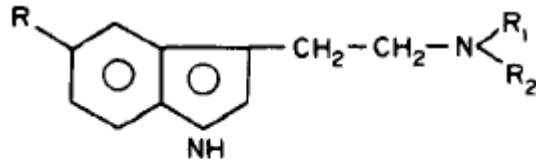


Şekil 2.8. Türkiye Ayvalıkta Bülent Gözcelioğlu tarafından çekilmiş *Paramuricea clavata*

2.2.6. Kaynak Özetleri

Tezin konusunu teşkil eden *Paramuricea clavata*'dan izole bileşikler.

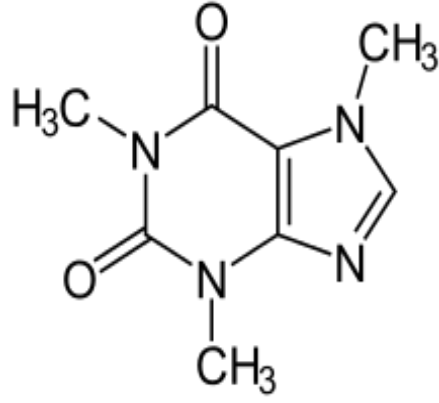
Cimino ve ark. (1978), *Paramuricea clavata*'dan altı indol alkaloid türevlerini izole etmişlerdir. Bu bileşikler altta verilmiş olan triptofan ve türevleridir (31).



- 1: R = R₁ = R₂ = H
- 2: R = R₁ = H; R₂ = -CH₃
- 3: R = OH; R₁ = R₂ = H
- 4: R = H; R₁ = R₂ = -CH₃
- 5: R = OH; R₁ = H; R₂ = -CH₃
- 6: R = OH; R₁ = R₂ = -CH₃

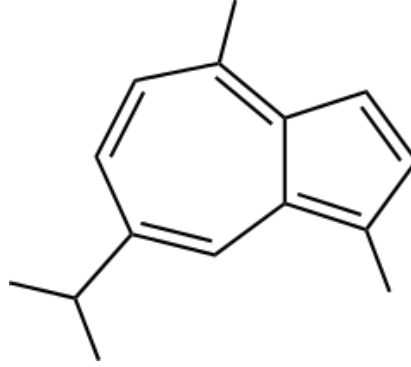
Şekil 2.9. Triptofan ve türevleridir

Imre ve ark. (1987), Aynı tür mercandan kafeini izole etmişlerdir (32).



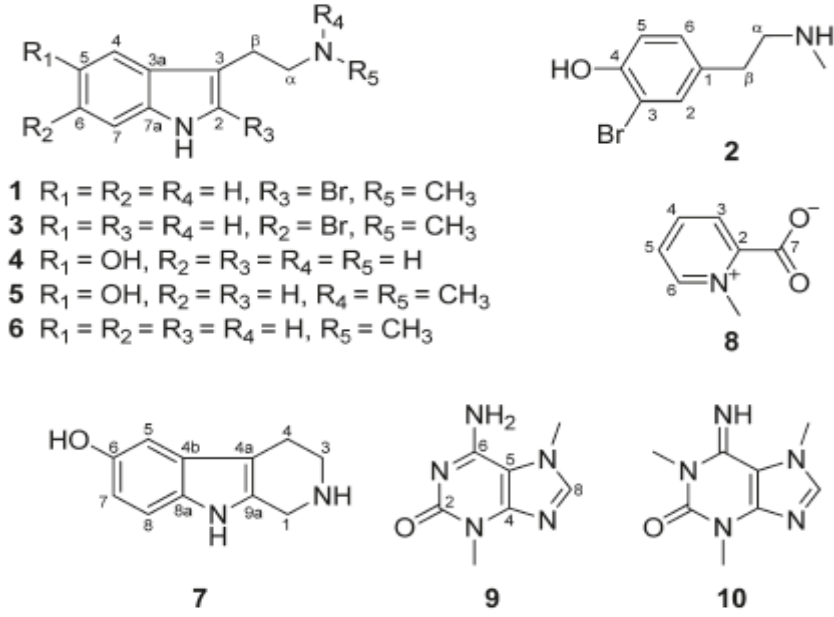
Şekil 2.10. Kafein

Imre ve ark. (1981), Deniz Mercanı *Paramuricea clavata*'dan guaiiazulen pigmenti izole etmişlerdir (32).



Şekil 2.11. Guaiiazulen

Nicolas Penez ve ark. (2012), *Paramuricea clavata* ile yaptıkları çalışmada hem antifouling aktivitesini araştırmış hem de ikisi yeni (2-Bromo-N-metilriptamin ve 3-Bromotiramin) ve sekizi bilinen bileşik (6-Bromo-N-metilriptamin, bufotenin, 1,3,7-trimetilisoguanin, N-metilriptamin, serotonin, N-metilriptamin, 6-Hidroksitetrahydro-β-karbolin ve linderazulen) olmak üzere toplam on bileşik izole etmişlerdir. Bufotenin ve 1,3,7-trimetilisoguanin bileşiklerinin antibakteriyal özellik gösterdiği tespit etmişlerdir.



Şekil 2.12. İndol ve Pürin Alkaloitler

2-bromo-N-metiltryptamin (1) ve 3-Bromotiramin (2) bileşikleri ilk olarak izole edilmiştir. Bununla birlikte 6-Bromo-N-metiltryptamine (3) bileşiği daha önce sentezlenebilen bileşik olup ilk defa doğal olarak elde edilmiştir (32).

Paramuricea clavata'nın etkili maddeleri ve bioaktivitesi ile ilgili çalışmalar çok azdır. Literatür taramasında yukarıda verilen sekonder metabolitler dışında bir kaynak bulunamamıştır. Ancak, *Paramuricea clavata* ile yapılan ekolojik, uzaysal çeşitliliği ve üreme döngüsü üzerine çalışmalar vardır.

Andrea Gori ve ark. (2007), *Paramuricea clavata*'nın Batı Akdeniz'de uzaysal çeşitliliğini ve üreme döngüsü üzerine çalışmalar yapmıştır. Bu çalışma sonucunda Medes adasının 600 km'lik aralıkta çeşitliliği, yerleşim alanları incelenmiştir. *Paramuricea clavata*'nın üreme döngüsünün en fazla Eylül ayında olduğu belirlenmiş ve uzaysal yerleşim alanlarının yoğunluğu saptanmıştır (33).

Michele Mistri. (2009), *Paramuricea clavata*'nın Akdenizdeki popülasyonları üzerine ekolojik gözlemler gerçekleştirmiştir. Bunun sonucunda *Paramuricea clavata* kolonileri ve onların yaşam alanları incelenmekle beraber yıllık gelişim hızları da belirlenerek kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda yıllık sekonder üretim miktarı hesaplanmıştır (34).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

3.1. Çalışmanın Amacı

Denizler, çeşitli hastalıklara karşı kullanılan ve kullanılabilen olan, henüz keşfedilmemiş ya da nadir olarak rastlanan ikincil ürünler açısından zengin kaynaklardır. Denizlerin biyolojik ve kimyasal çeşitliliği, ciddi hastalıkların tedavisinde kullanılacak önemli metabolitlerin eldesinde rol oynar. Yapılan kimyasal çalışmalar, ender görülen ikincil ürünler ve onların geniş bir yelpaze gösteren biyoaktivitelerini ortaya çıkarmıştır. Yapılan çalışmalar deniz organizmalarından elde edilen sitotoksik maddelerin %50'sinin sünger ve mercan gibi denizsel çevrede yaşayan organizmalardan izole edildiğini göstermiştir. Bu araştırma tezinin amacı, Türkiye denizlerinde bulunan *Paramuricea clavata*'nın sekonder metabolitlerinin izolasyonu ve ekstresinin biyoaktivitesinin tespit edilmesidir. Ülkemiz denizlerinde yaşayan canlılarla (balıklar ve algler hariç) yapılan çalışmaların azlığı göz önüne alınca, yeni bioaktif madde/lerin bulunma olasılığı yüksektir. *Paramuricea clavata* ile yapılan çalışmaların azlığı ve Türkiye denizinde ki bu tür ile bugüne kadar çalışma yapılmamış olması nedeniyle tezin konusu özgündür. Bu çalışma sonunda bulunacak sonuçlar da *Paramuricea clavata* ile ilgili sayısı az olan çalışmalara katkı sağlayacaktır.

Aynı zamanda, Türk denizlerinde bulunan *Paramuricea clavata*'da bulunan sekonder metabolitlerin kimyasal analizleri farmasötik amaçla kullanılabilen yeni biyoaktif moleküllerin bulunması için bir adım olabilecektir. Bu çalışmada, literatür kayıtlarına göre sadece 3 kimyasal çalışma yapılmış olan, Ege denizinden toplanmış olan yumuşak mercan *Paramuricea clavata*'dan hazırlanan ekstreden (MeOH:CHCl₃ 1:1) önce iki biyoaktivite çalışması yapılmış, ve biyoaktivite sonucuna göre etken maddelerin izolasyonu, yapı tayini ve bazı etken maddelerin YSBK ile tespiti gerçekleştirilmiştir. Diğer maddelerin yapı tayini çalışmalarına devam edilecektir.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1. Araştırma Materyali

4.1.1. *Paramuricea clavata*

Materyal, 2015 Nisan ayında Ege bölgesi, Ayvalık 40 metre derinlikten Dr.Bio. Bülent Gözcelioğlu tarafından toplanmış ve ekstraksiyon öncesinde %70 etanol içinde saklanmıştır. Tür tanımı, Dr. Bio. Bülent Gözcelioğlu tarafından yapılmıştır. Örnek Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalındaki özel Herbaryumda saklanmıştır. Altta verilen resim Dr. Bio. Bülent Gözcelioğlu tarafından çekilmiştir.



Şekil 4.1. *Paramuricea clavata*

4.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Ekstraksiyon ve sekonder metabolitlerin izolasyonu için çözücü olarak; teknik olarak saflıkta metanol, kloroform, kolon için de petrol eteri, kloroform, metanol, etil asetat, YSBK için de asetonitril (LiChrosolv HPLC grade, Merck), metanol (LiChrosolv HPLC grade, Merck) ve distile su, belirteç olarak da anisaldehit (4-metoksibenzaldehit) (Merck, Darmstadt, Germany) kullanılmıştır.

4.2. Yöntem

4.2.1. Ekstraksiyon

Paramuricea clavata örneği küçük parçalara kesilip ve kesilen bu parçalar erlanmayerlerle çalkalayıcıda odasıcaklığında 1 saat metanol: kloroform 1:1 kullanılarak ekstre edilmiştir. Ekstrakt süzülerek alınıp ve numunelere tekrar metanol: kloroform ilave edilip aynı işlem tekrarlanmıştır. Bu işlem numunenin rengi iyice açılıncaya kadar devam edilmiş sonra toplanan ekstraktlar rotavaporda 40°C de yoğunlaştırıldı ve 20 g *P.clavata* ekstresi elde edilmiştir.

4.2.2. Ekstrenin Vakum Sıvı Kromatografisi (VSK) ile Fraksiyonlara Ayırımı

Elde dilen ekstre metanol: kloroform ekstresi iyice toz haline getirilinceye kadar silica jel ile karıştırılmıştır. Çapı 6 cm boyu 20 cm olacak şekilde normal faz silika jel (Silika jel 60 Fluka) ile doldurulmuş, 30 cm boyunda kolona uygulanmıştır. Üzeri önce silika ile sonra deniz kumu (Sea Sand, Merck) ile kaplanmıştır.



Şekil 4.2. VSK

4.2.3. Elüsyon Sistemi

VSK ile kolondan fraksiyonlar toplanmıştır.

Çizelge 4.1. VSK ile kullanılan elüsyon sistemi

Fraksiyonlar	Çözücü 1	Çözücü 2	Toplam hacim
Fraksiyon 1 (10:1)	Petrol eter 500 ml	Etil Asetat 50 ml	550 ml
Fraksiyon 2 (5:1)	Petrol eter 500 ml	Etil Asetat 100 ml	600 ml
Fraksiyon 3 (2:1)	Petrol eter 400 ml	Etil Asetat 200 ml	600 ml
Fraksiyon 4 (1:1)	Petrol eter 300 ml	Etil Asetat 300 ml	600 ml
Fraksiyon 5 (20:1)	Kloroform 600 ml	Metanol 30 ml	630 ml
Fraksiyon 6 (10:1)	Kloroform 600 ml	Metanol 60 ml	660 ml
Fraksiyon 7 (5:1)	Kloroform 500 ml	Metanol 100 ml	600 ml

Toplanan fraksiyonlar rotavaporda yoğunlaştırılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kurumuş olan fraksiyonların tartımları alınmıştır.

Fr 1 = 347 mg.

Fr 4 = 310 mg.

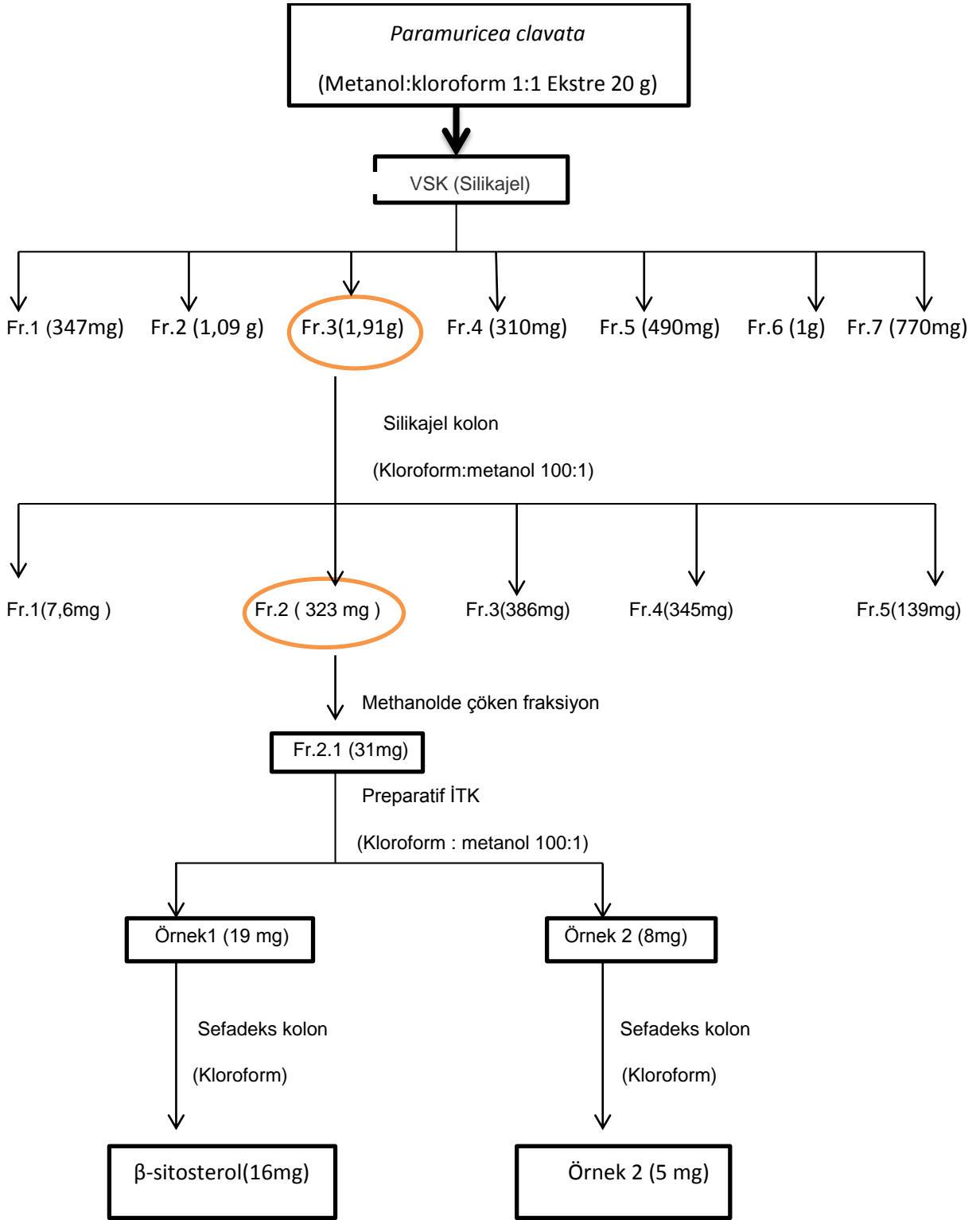
Fr 7 = 770 mg.

Fr 2 = 1,09 g.

Fr 5 = 490 mg.

Fr 3 = 1,91g.

Fr 6 = 1 g.



Şekil 4.3. *Paramuricea clavata* ekstresinin madde izolasyonu akış şeması

4.2.4. İzolasyon

Üçüncü fraksiyon olan (Petrol eter: Etil Asetat 2:1) fraksiyon 3'ün YBSK kromatogramında altı majör pikin gözlenmesi üzerine izolasyona fraksiyon 3 ile devam edilmesine karar verilmiştir. Ekstreden madde izolasyonu ve saflaştırma işlemleri bazı kromatografi teknikleri kullanılarak yapılmıştır. Bu tekniğin seçiminde ekstre miktarı ve ekstredeki bileşenlerin İTK plağındaki Rf değerleri göz önünde bulundurulmuştur.

4.2.5. Kromatografik Yöntemler

4.2.5.1. İnce tabaka kromatografisi

İTK, bir karışımdaki birleşenlerin ve saflığın saptanması için uygun, basit ve hızlı bir yöntemdir. Ayrıca kolon kromatografisi için kullanılacak solvan sisteminin belirlenmesi içinde kullanılmaktadır.

İTK analizi için, örneklerden spatül ucu ile eppendorf tüplerine aktarılmıştır ve üzerlerine kloroform ilave edilerek ultrasonik banyoda (Bandalin Sonorex rk52h), ekstelerin çözülmesi sağlandıktan sonra İTK plaklarına, UV altında kontrol edilerek aynı konsantrasyonda uygulama yapılmıştır.

Kullanılan plak: Hazır kaplanmış alüminyum plak (Merck 5715)

Adsorban: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

Sürüklenme mesafesi: 10 cm

Lekelerin gözlenmesi: UV₂₅₄, Anisaldehit çözeltisi püskürtülüp ısıtıcı plak üzerinde yaklaşık 100°C de 1-2 dakika bekletilmiştir. Ekstrede Alkaloid kontrolü için Dragendroff çözeltisi püskürtülmüştür.

Anisaldehit çözeltisi aşağıdaki verilen prosedüre göre hazırlanmıştır;

p-Anisaldehit

5.1 mL p-anisaldehit

2.1 mL asetik asit

6.9 mL derisik sülfürik asit (%98)

186 mL Etanol (%95)

Dragendorff Reagenti (Aminler ve organik bazlar için)

Cözelti A: 1.7 g BiONO₃ (bizmut nitrat)

100 mL Su: Asetik Asit (80: 20)

Çözelti B: 40 g KI 100 mL water

5 mL Cözelti A

5 mL Cözelti B

20 mL Asetik Asit

70 mL Su

4.2.5.2. Vakum Sıvı Kromatografisi

VSK ile miktarca çok olan örneklerin kaba ayırımı için kullanılan yöntemlerden birisidir. Yukarıda belirttiğimiz gibi (20g) bol olan maddemizi az polardan çok polara doğru ayırımı gerçekleştirilmiştir ve yukarıda verilmiş olan orana göre fraksiyonları toplanmıştır.

4.2.5.3. Kolon kromatografisi

Kolon kromatografisinde adsorban olarak sefadeks ve silika jel kullanılmıştır. VSK'dan toplanan fraksiyonlar İTK sonuçlarına göre belirlenen sabit faz ve mobil faz çözücü sistemine göre kolona uygulanmıştır. Ayırımı için az polardan çok polara olacak şekilde aşağıda verilen çözücü sistemi uygulanmıştır;

1. Kloroform: Metanol	150:17.	7. Kloroform: Metanol	50:1
2. Kloroform: Metanol	120:1	8. Kloroform: Metanol	40:1
3. Kloroform: Metanol	100:1	9. Kloroform: Metanol	30:1
4. Kloroform: Metanol	80:1	10. Kloroform: Metanol	20:1
5. Kloroform: Metanol	70:1	11. Kloroform: Metanol	10:1
6. Kloroform: Metanol	60:1	12. Kloroform: Metanol	5:1

Çalışmaya fraksiyonlardan üçüncüsü olan Kloroform: Metanol (100:1) ile devam edilmeye karar verilmiştir. Çünkü bu fraksiyonda metanolde çökme gözlenmiştir. Bulgularda verilmiş olan iki bileşik izole edilmiştir.

4.2.5.4. Sefadeks kolon

Kolonda kullanılacak solvan sistemini belirlemek için yapılan çözünürlük testi sonucu kloroform sisteminin kullanılmasına karar verilmiştir.

Kullanılacak materyal (Sephadex LH-20) belirlenen solvan sistemi ile ıslatılarak bekletilmiştir. Ardından kolon ıslatılan safadeks meteryali ile doldurulmuştur.

Kolona uygulanacak fraksiyon, kullanılan solvan sistemi içinde ultrasonik banyoda çözülmüştür. Çözülmüş örnek kolona uygulanmış ve devamlı solvan akışı sağlanmıştır. Çözücünün akış hızı yaklaşık 20 saniyede 1 damla olacak şekilde ayarlanıp fraksiyon toplayıcı yardımıyla her 15 dakikada bir tüp değiştirilerek fraksiyonlar toplanmıştır.

Tüplere toplanan fraksiyonların İTK analizleri yapıldı ve benzer fraksiyonlar birleştirilerek 10 fraksiyon elde edildi, bu fraksiyonlar rotavaporda yoğunlaştırılmış ve kurutulmuştur.

4.2.5.5. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK)

YBSK örnekleri hazırlanırken, öncelikle eppendorf tüpleri içinde, YBSK saflığındaki metanolde çözülmüş örneklerden eşit miktarlarda İTK pağına uygulanmıştır ve lekeler UV 254 altında görülen lekelerle bakılarak, yüksek konsantrasyonda olduğu görülen örneklerde metanol ile seyreltme yapılarak YBSK analizleri için uygun konsantrasyon ayarlanmıştır. 5 dakika süreyle santrifuj edildi ve en az 400 µl olacak şekilde viyallere aktarılmıştır.

Analiz için;

YSBK : Agilent 1200 Series

Kolon : Eclipse XDB-C18 (150 x4,6 mm, 5 µm partikül büyüklüğü)

Mobil faz : Metanol- Su çözeltisi

Enjeksiyon hacmi : 20 µl

Akış hızı : 1ml/dak

Pompa : P 580, Dionex

Dedektör : UVD 340 S – Photo Diode Array Dedector, Dione

Program : Chromeleon version 6.3

Bütün fraksiyonların YSBK analizi yapıldı. Bütün YSBK analizleri altta verilmiş çözücü sisteminde aynı koşullarda yapılmıştır.

Çizelge 4.2.YSBK çözücü sistemi

Zaman	%A (Metanol)	%B (Su)	Akış hızı
0.00	10,0	90,0	1,000
5.00	10,0	90,0	1,000
35.00	0,0	100,0	1,000
45.00	0,0	100,0	1,000
55.00	90,0	10,0	1,000
60.00	90,0	10,0	1,000

Fraksiyon 3'ün ve izole bileşiklerinin YSBK analizleri aynı koşullarda altta çözücü sisteminde yapılmıştır.

Çizelge 4.3.YSBK çözücü sistemi

Zaman	%B (Su)	%C (Asetonitril)	Akış hızı
0.00	90,0	10,0	1,000
5.00	90,0	10,0	1,000
35.00	0,0	100,0	1,000
45.00	0,0	100,0	1,000
55.00	90,0	10,0	1,000
60.00	90,0	10,0	1,000

4.2.5.6. Analitik YSBK

Analitik YSBK elde edilen fraksiyonlardaki piklerin dağılımını aydınlatmak, maddenin saflığını ve onların yapılarını aydınlatmak için kullanılmıştır. Maddelerin alıkoyma zamanlarına (Rt) göre maddeler sabit faz ve mobil faz arasında kolonda ayrılmıştır. Cihazın balansı sağlandıktan sonra değişik kromofor içeren bileşikler UV-Vis diode detektör 240 nm, 254 nm, 280 nm ve 365 nm dalga boylarında detekte edilmiştir.

4.2.6. İzole edilmiş bileşikleri yapı aydınlatılması

Yapıların aydınlatılması için birçok yöntem vardır. Bu yöntemler kütle spektrometresi, elektron iyonizasyon spektroskopi, hızlı atom bombardımanı, elektro spre y iyonizasyon kütle spektrometresi, yüksek çözünürlük kütle spektrometresi, optikal aktivite, UV analizi ve NMR yöntemleri kullanılabilir. Bu çalışmada izole edilen 2 maddenin yapısının aydınlatılması için UV analizi ve Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) yöntemi kullanılmıştır.

4.2.6.1. Bileşiklerin UV analizleri

İzole edilen bileşiklerin UV spektrumları alındı. Bulunan değerleri literatür ile karşılaştırılmıştır.

4.2.6.2. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR)

¹H ve ¹³C NMR spektralarının 300K'deki değerleri Bruker DPX 300, ARX 400, 500 or AVANCE DMX 600 NMR spektrometrelerinde kaydedilir. Tüm 1D ve 2D spektraları standard Bruker yazılımıyla elde edildi. Örnekler uygun deuteratlı çözücülerde (örn. kloroform-d₁ (Merck, Darmstadt, Germany); diklorometane-d₂; DMSO-d₆; metanol-d₄ (Eurisotop, France)) çözülmüş ve kalibrasyon için internal standart olarak alınmıştır. Gözlemlenen kimyasal değişim değerleri ppm ve eşleşme katsayısı (J) Hz olarak verilmiştir.

4.3. Biyoaktivite bulgular

4.3.1. Hep-2 hücrelerinde dizileri üzerinde sitotoksik etki incelemesi

Metot:

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 asetonla hazırlanmış 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'de (phosphate buffered saline) 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 absorbanslar okunmuştur.

4.3.2. Radikal süpürücü etki incelemesi

Metot:

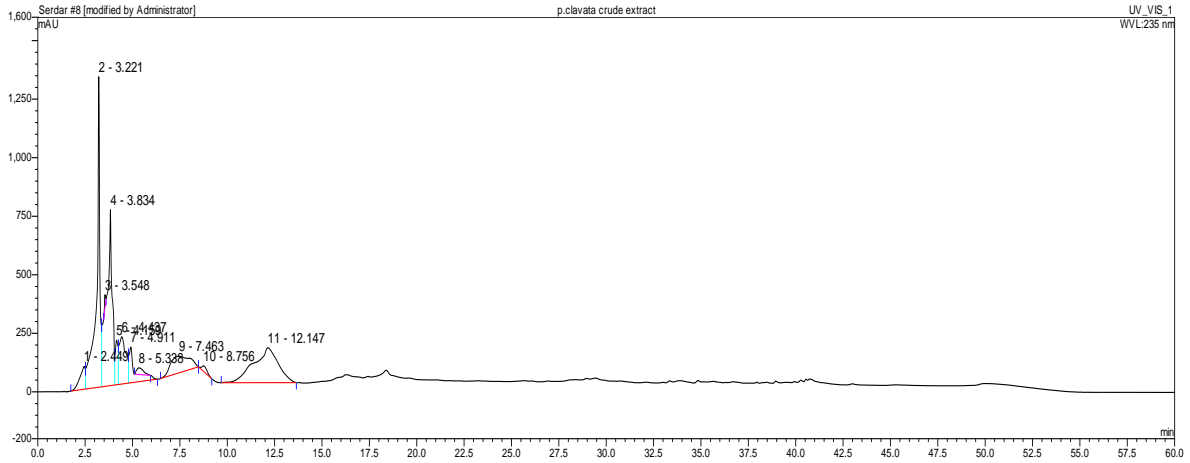
Deney ortamında, DMSO (Dimetil sülfoksit) tarafından oluşturulan süperoksit radikali, NBT (Nitroblue tetrazolium) ile renkli diformazan bileşiği oluşturur. Deney; antioksidan madde ile teması sonucunda süperoksit radikalının azalan konsantrasyonunun renkli diformazan bileşiği üzerinden ölçülmesi esasına dayanır. NBT'nin DMSO'daki 1 mg/ml çözeltisinden 0.1 ml, 96 kuyucuklu plakalardaki kuyucuklara aktarıldıktan sonra üzerine ekstrenin DMSO ile çözülerek hazırlanan asetonla hazırlanmış ekstraktın 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 absorbans ölçülmüştür. SO radikali süpürücü etki; DMSO, NBT, ve alkalın DMSO içeren çözeltinin (kör) absorbansının, bileşikleri içeren çözeltilerin absorbanslarıyla karşılaştırılması sonucu tayin edilmiştir. Çalışmamızda standart olarak, doğal birer antioksidan olan askorbik asit (AA) ve kersetin kullanılmıştır. Standartlar; denenen ekstreler ile aynı şartlarda ve konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. İTK ve YSBK Analiz Sonuçları

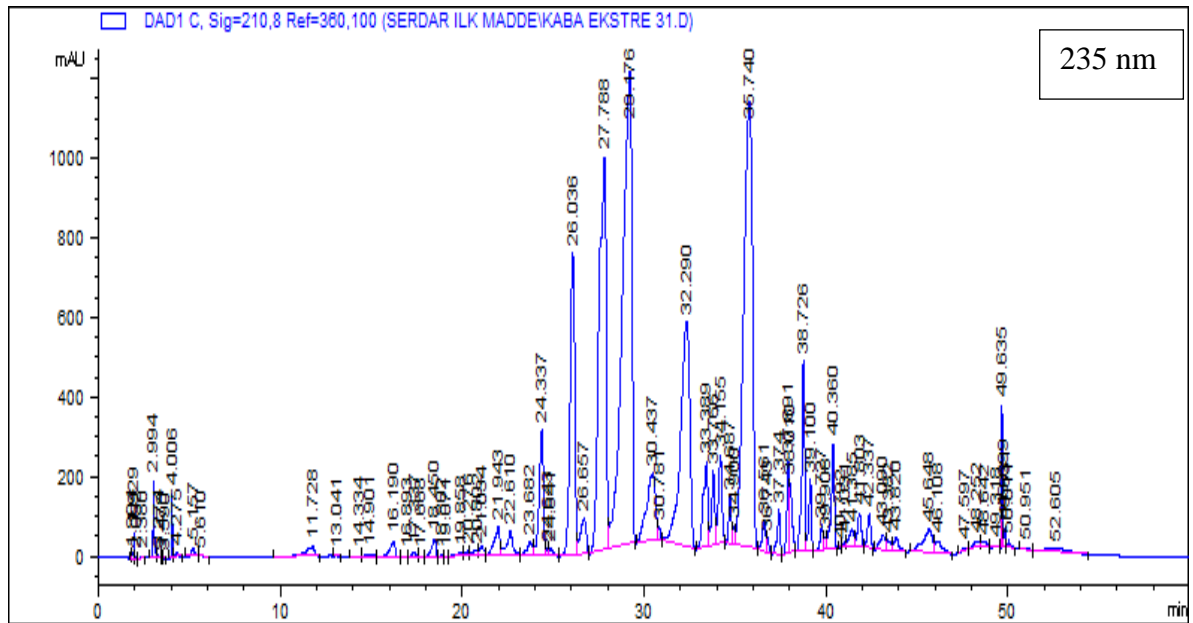
5.1.1. Mercan *Paramuricea clavata*'nın metanol: kloroform (1:1) ekstresinin YSBK analizi



Şekil 5.1. *Paramuricea clavata* ekstresinin YSBK Kromatogramı

5.1.2. Fraksiyon 3 Fazının YSBK sonuçları

Altta verilmiş olan 4 majör (26.036, 27.788, 27.788, 36.740) ve 2 minor (24.337,38.726) maddeyi içermesi fraksiyon 3'ün etken madde izolasyonu için seçilmesinin ana nedenidir.



Şekil 5.2. Analitik YBSK'de *Paramuricea clavata*'nın 3. fraksiyonunun kimyasal profili

5.1.3. VSK ile elde edilen Fraksiyon 3'ün İTK Analizi

Fraksiyon 3'ün YSBK analizi sonucunda İTK yöntemiyle de kloroform: metanol (50:1) çözücü sisteminde madde sayısına bakıldı. YSBK belirlenen 6 madde tekrar tespit edildi.



Şekil 5.3. VSK ile elde edilen Fraksiyon 3'ün İTK kromatogramı

Yukarıda verilmiş İTK sonucu olan maddelerin Rf değerleri altta verilmiştir.

$$Rf_1 = 0,17$$

$$Rf_3 = 0,37$$

$$Rf_5 = 0,60$$

$$Rf_2 = 0,23$$

$$Rf_4 = 0,53$$

$$Rf_6 = 0,68$$

5.1.4. VSK ile elde edilen 3 no'lu Fraksiyondan Kolon Kromatografisi ile elde edilen Çökmüş olan Maddenin İTK Analizi

3 no'lu Fraksiyon kolona uygulandıktan sonra kloroform: metanol (100:1) metanol çözücü sistemi içerisinde çökme gözlenmiştir. Kloroform: metanol (100:1) çözücü sisteminde denenmiş olan fraksiyonun İTK analizi altta verilmiştir.



Şekil 5.4. 3 no'lu Fraksiyondan Kolon Kromatografisi ile elde edilen çökmüş olan kısmının İTK kromatogramı

Yukarıda verilmiş olan kromatogramın Rf değerleri altta verilmiştir.

İlk spot için $R_{f1} = 0.28$ (örnek1)

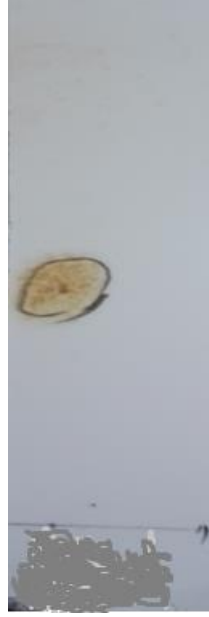
İkinci spot için $R_{f2} = 0.74$ (örnek2)

Örnek 1

5.1.5. İzole edilen örnek 1'in kloroform: methanol (100:1) çözücü sisteminde İTK analizi

Preparatif İTK ile ayırımı gerçekleştirilen örnek 1, daha sonrasında ise sefadeks kolon ile saflaştırılmıştır. Örnek 1'in İTK analizi aşağıda verilmiştir.

İlk spot için $R_{f1} = 0.28$ (örnek 1)



Şekil 5.5. Toplanan fraksiyonlardan kloroform: metanol (100:1) metanolde çökmüş olan maddenin (örnek1) İTK Analizi Sonuçları

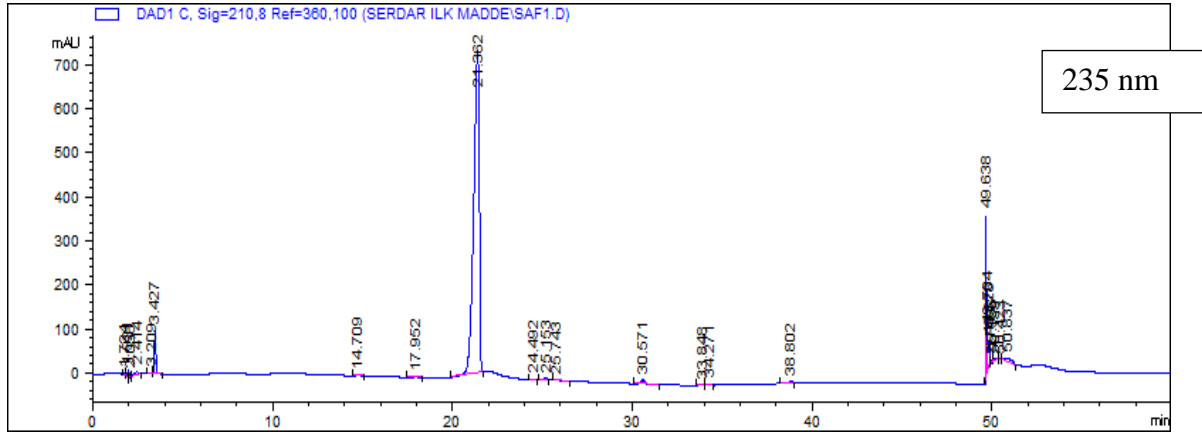
5.1.6. Farklı solvanla elde edilen örnek 1'in İTK analizi sonucu

İzole edilen maddemizin saf olup olmadığını kontrol amaçlı farklı solvan sisteminde denenmiştir. Bu çalışmada farklı polariteye sahip petrol eteri: aseton (10: 1) çözücü sistemi denenmiştir. Bu çözücü sisteminde de tek spot gözlemlenmiştir.



Şekil 5.6. Farklı solvanla (petrol eteri: aseton (10:1)) elde edilen İTK sonucu

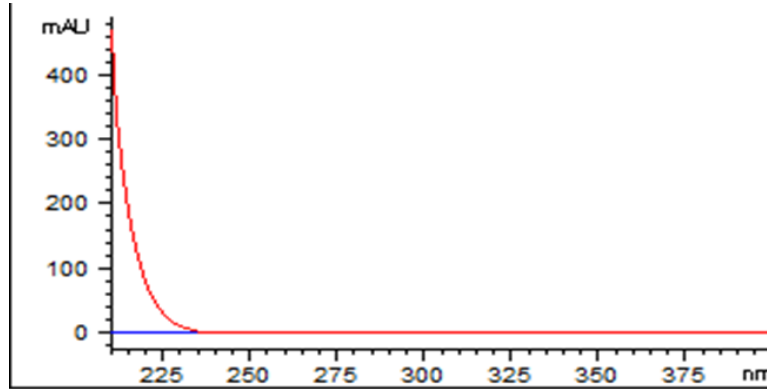
5.1.7. İzole edilen örnek 1'in YSBK Analizi.



Şekil 5.7. Örnek 1'in YSBK Analizi

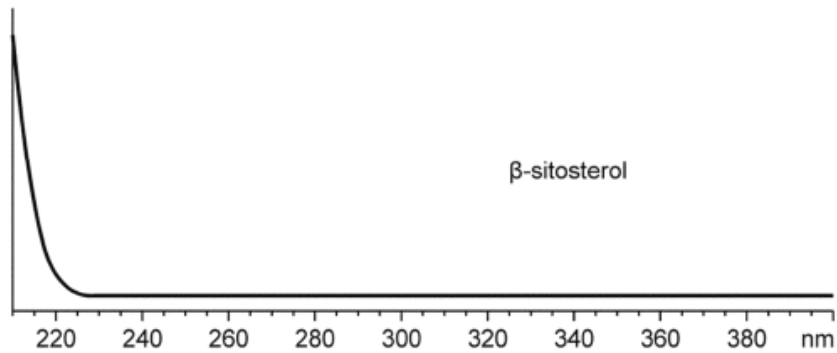
5.1.8. Preparatif İTK ile izole edilen örnek 1'in UV spekturumu

Örnek 1 en güçlü UV absorbanısı 206 nm'de vermiştir. Bu ölçüm Analitik YSBK ile belirlenmiştir.



Şekil 5.8. İzole örnek 1'in UV spekturumu

5.1.9. Madde 1'in literatür UV Spekturumu



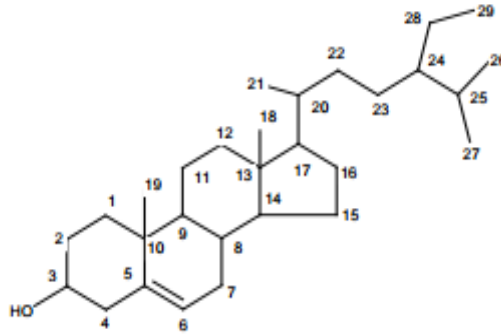
Şekil 5.9. Literatüre taraması sonucunda izole örnek 1'in 206 nm UV spekturumu (35)

5.2. İzole edilen Bileşiklerin NMR analiz sonuçları

İzole edilen β -Sitosterol, 17- (5-Etil-6-metilheptan-2-yl)-10, 13-dimetil-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol bileşiğinin NMR spektrumları altta gösterilmiştir.

Elde edilen ^1H ve ^{13}C NMR sonuçları ve UV absorpsiyonu literatüre göre karşılaştırılmış ve yapısının β -sitosterol olduğu bulunmuştur.

5.2.1. β -Sitosterol



Şekil 5.10. β -Sitosterol

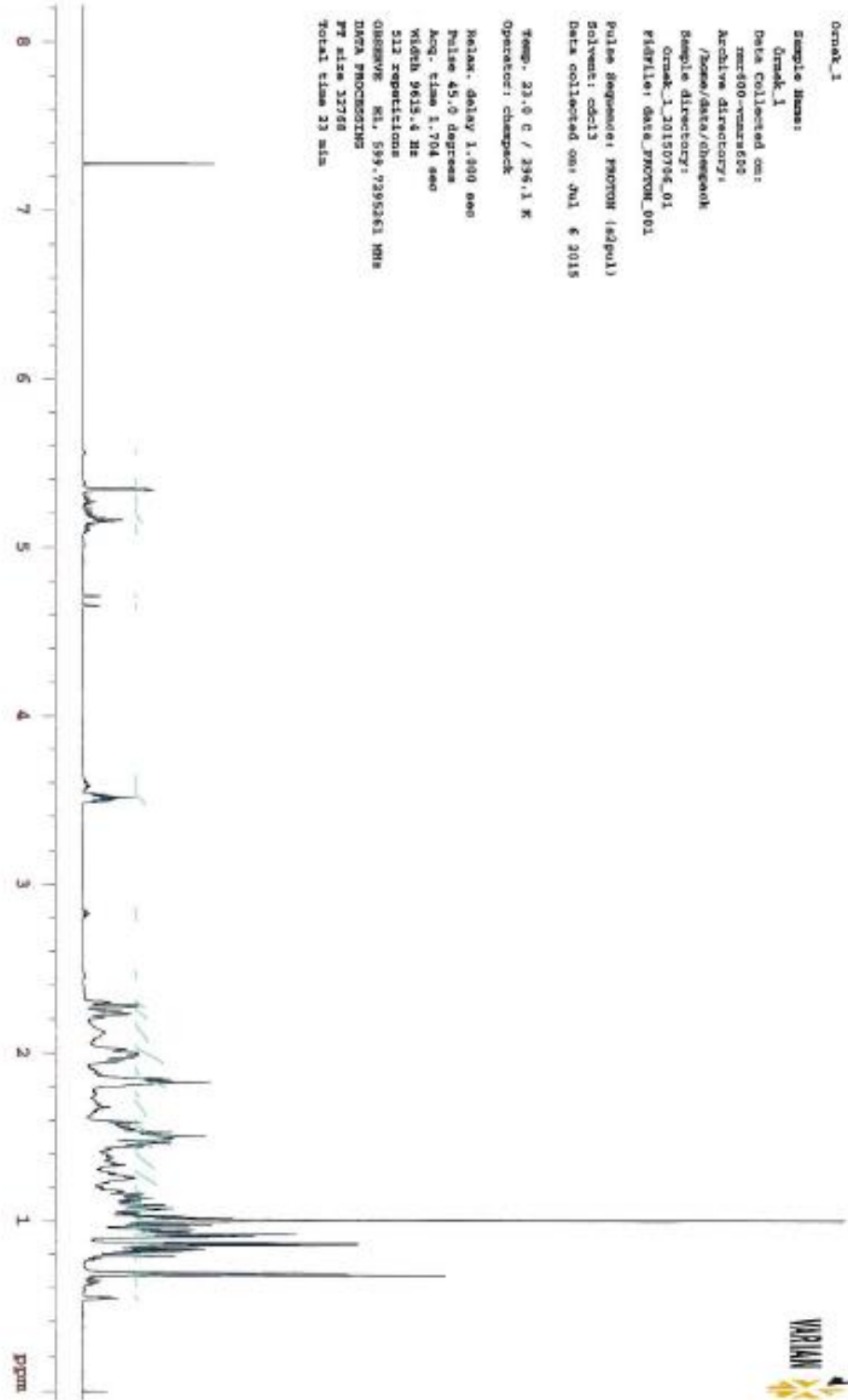
IUPAC isimlendirmesi : 17- (5-Etil-6-metilheptan-2-yl)-10,13-dimetil-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol

Molekül Ağırlığı : 414.707 g/mol

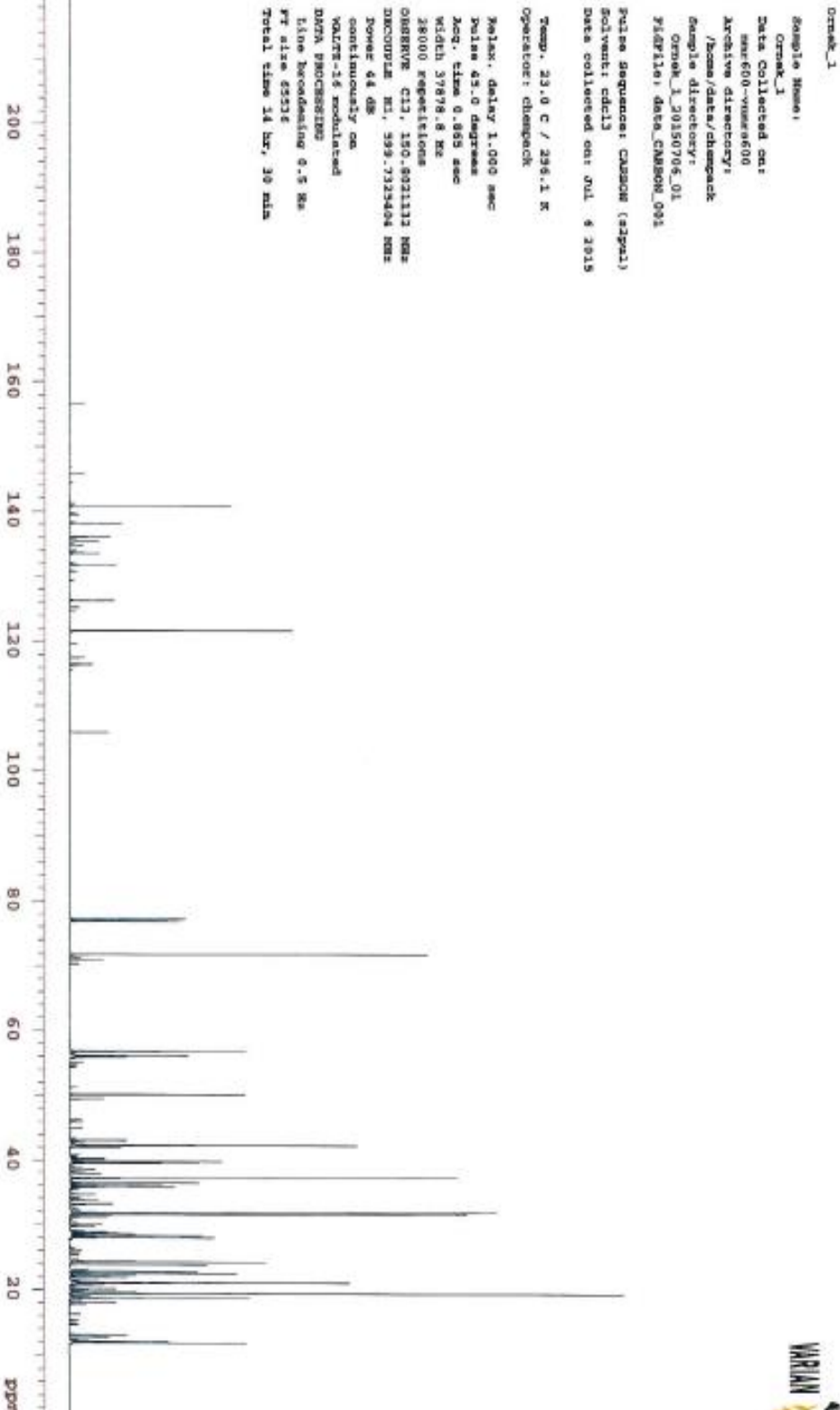
Molekül Formülü : $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$

CAS numarası : 19044-06-5

5.2.2. İzole edilmiş örnek 1 NMR analiz sonuçları



Şekil 5.11. Çalışmada izole edilen örnek 1'in ^1H -NMR analiz sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 5.12. Çalışmada izole edilen örnek 1'in ^{13}C -NMR analiz sonuçları gösterilmiştir.

5.2.3. β -Sitosterol NMR bulguları

Çizelge 5.1. Örnek 1 NMR sonuçları

Pozisyon		^{13}C
1	CH ₂	37,2
2	CH ₂	27,92
3	CH	71,7
4	CH ₂	37,4
5	C	140,746
6	CH	121,6
7	CH ₂	31,574
8	C	31,866
9	C	50,132
10	C	36,4
11	CH ₂	24,307
12	CH ₂	39,761
13	C	42,22
14	CH	56,02
15	CH ₂	28,217
16	CH ₂	28,5
17	CH	55,774
18	CH ₃	36,1
19	CH ₃	19,4
20	CH	34,79
21	CH ₃	26,04
22	CH ₂	45,9
23	CH ₂	22,6
24	CH	12,02
25	CH	30
26	CH ₃	19,593
27	CH ₃	19,309
28	CH ₂	18,704
29	CH ₃	13,836
30		OH (C3 pozisyon)

Literatüre eşleştirmesi

β -Sitosterol için literatürün ve elde edilen sonucun karşılaştırılması Venkata ve ark., 2012 senesinde yaptığı çalışmasına göre yapılmış olup sonuçlar benzerlik göstermektedir (36).

5.2.4. İzole edilen ikinci madde örnek 2 sonuçları

5.2.4.1. İzole edilen örnek 2'in kloroform: metanol (100:1) çözücü sisteminde İTK analizi

İkinci spot için $R_f=0.74$ (Örnek 2)



Şekil 5.13. Örnek 2 İTK Analizi Sonucu

5.2.4.2. Farklı solvanla elde edilen örnek 2'nin İTK analizi sonucu

İzole edilen maddemizin saf olup olmadığını kontrol amaçlı farklı solvan sisteminde denenmiştir. Bu çalışmada farklı polariteye sahip petrol eteri: etil asetat (10:1) çözücü sistemi denenmiştir. Bu çözücü sisteminde de tek spot gözlemlenmiştir.



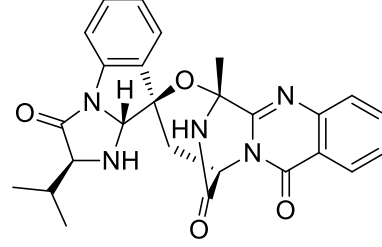
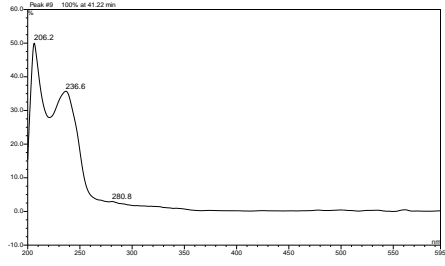
Şekil 5.14. Farklı çözücü sistemiyle (petrol eteri: aseton (10:1)) elde edilen İTK sonucu

5.3. Örnek 2 Sonuçları

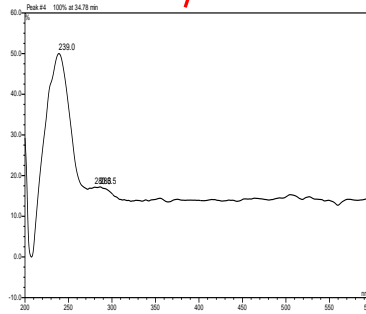
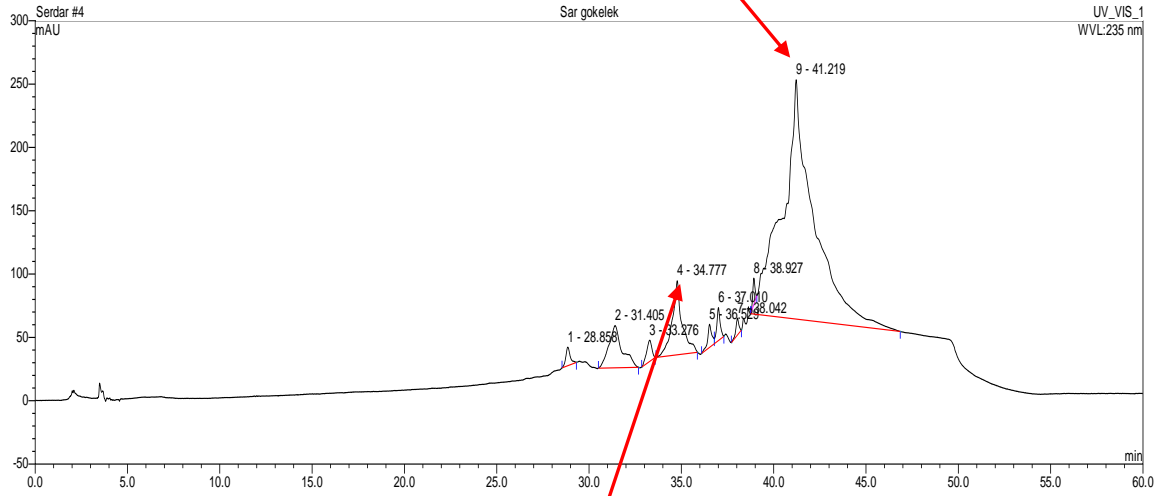
İkinci maddenin saflaştırma işlemine ve yapısının aydınlatılması devam edilmektedir.

5.4. Etkili Maddelerin YSBK ile Tespiti

5.4.1. Fraksiyon 3'ün diğer etkili maddelerinin YSBK ile tespiti



İhtimal: Anikuaizolin A

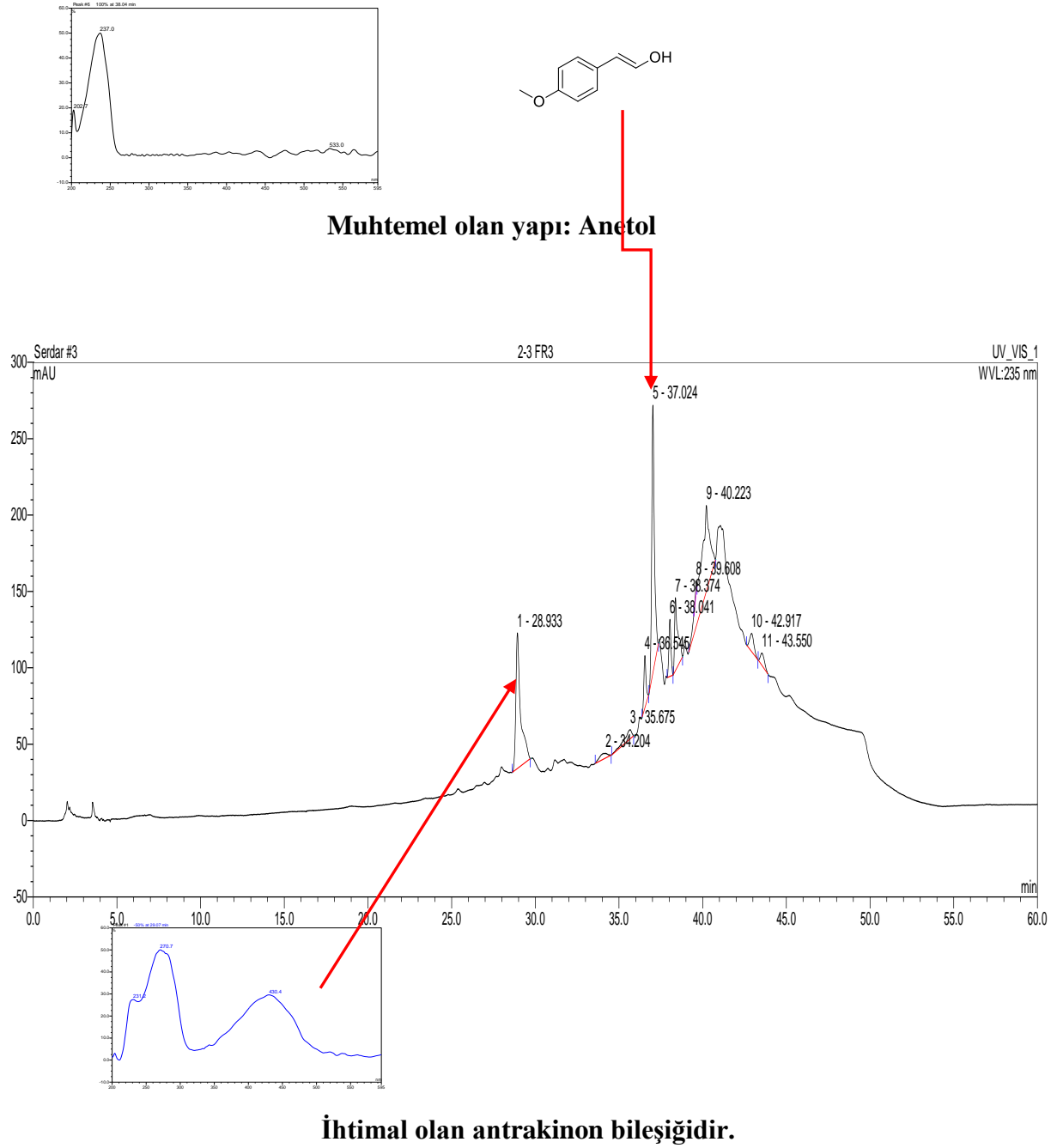


Tek benzodiazepin UV absorpsiyonu

Şekil 5.15. 3 no'lu fraksiyonun etken maddeleri (37).

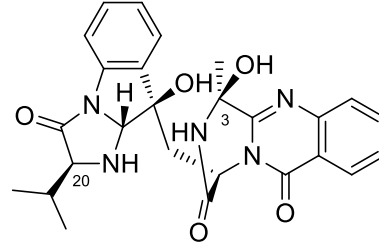
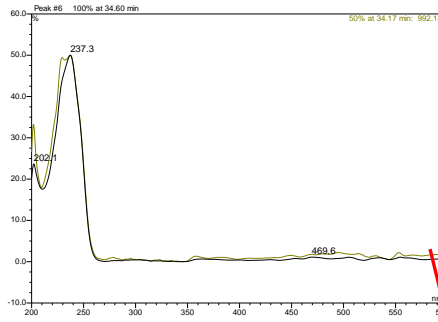
5.4.2. Fraksiyon 2, 5, 6 ve 7'deki etkili maddelerin YSBK ile tespiti

5.4.2.1. 2 no'lu Fraksiyonun etkili maddelerinin YSBK ile tespiti

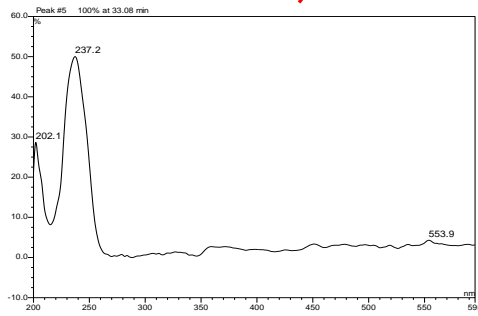
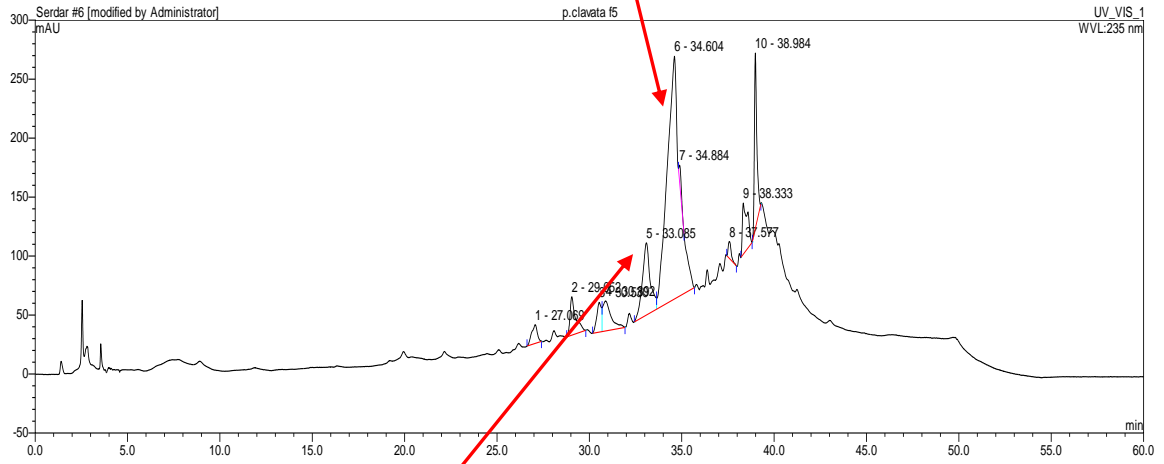


Şekil 5.16. 2 no'lu fraksiyonun son 3 fraksiyonun etken maddeleri (38)

5.4.2.2. Fraksiyon 5'deki diğer etkili maddelerin YBSK ile tespiti



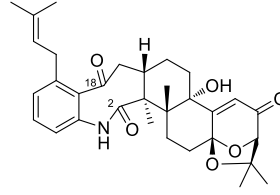
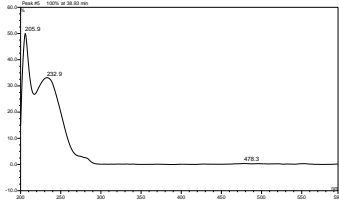
Olabilecek muhtemel yapı: Anikuaizolin C



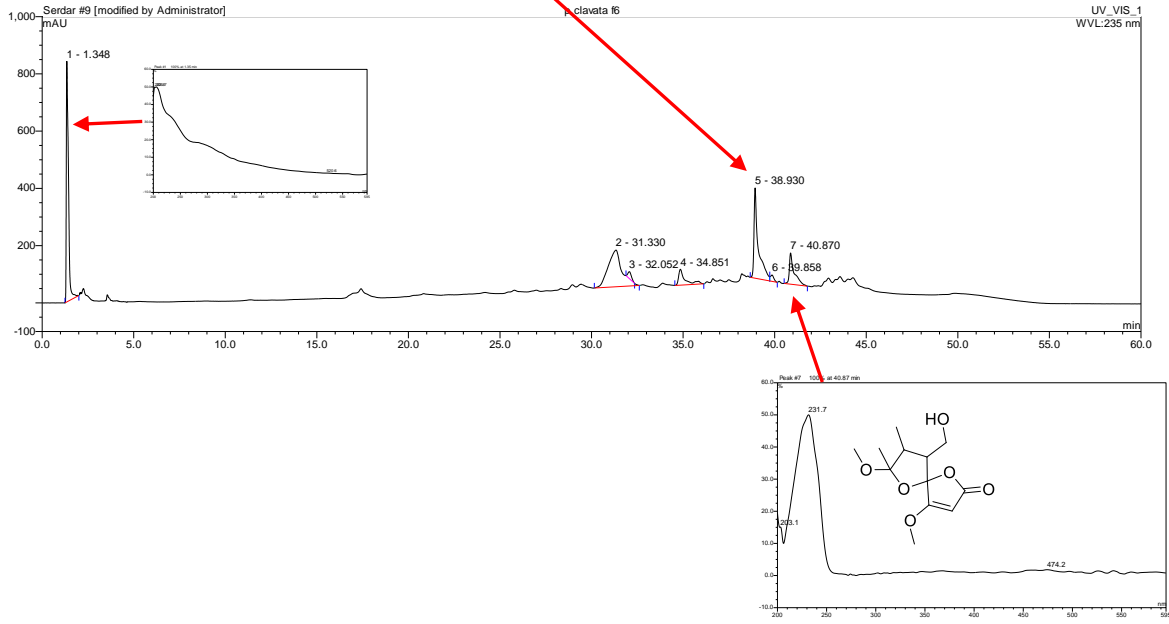
Şekil 5.17. 5 no'lu fraksiyonun maddeleri

Yukarıda verilmiş olanla benzer UV absorpsiyona sahiptir (37).

5.4.2.3. Fraksiyon 6'deki diğer etkili maddelerin YBSK ile tespiti.



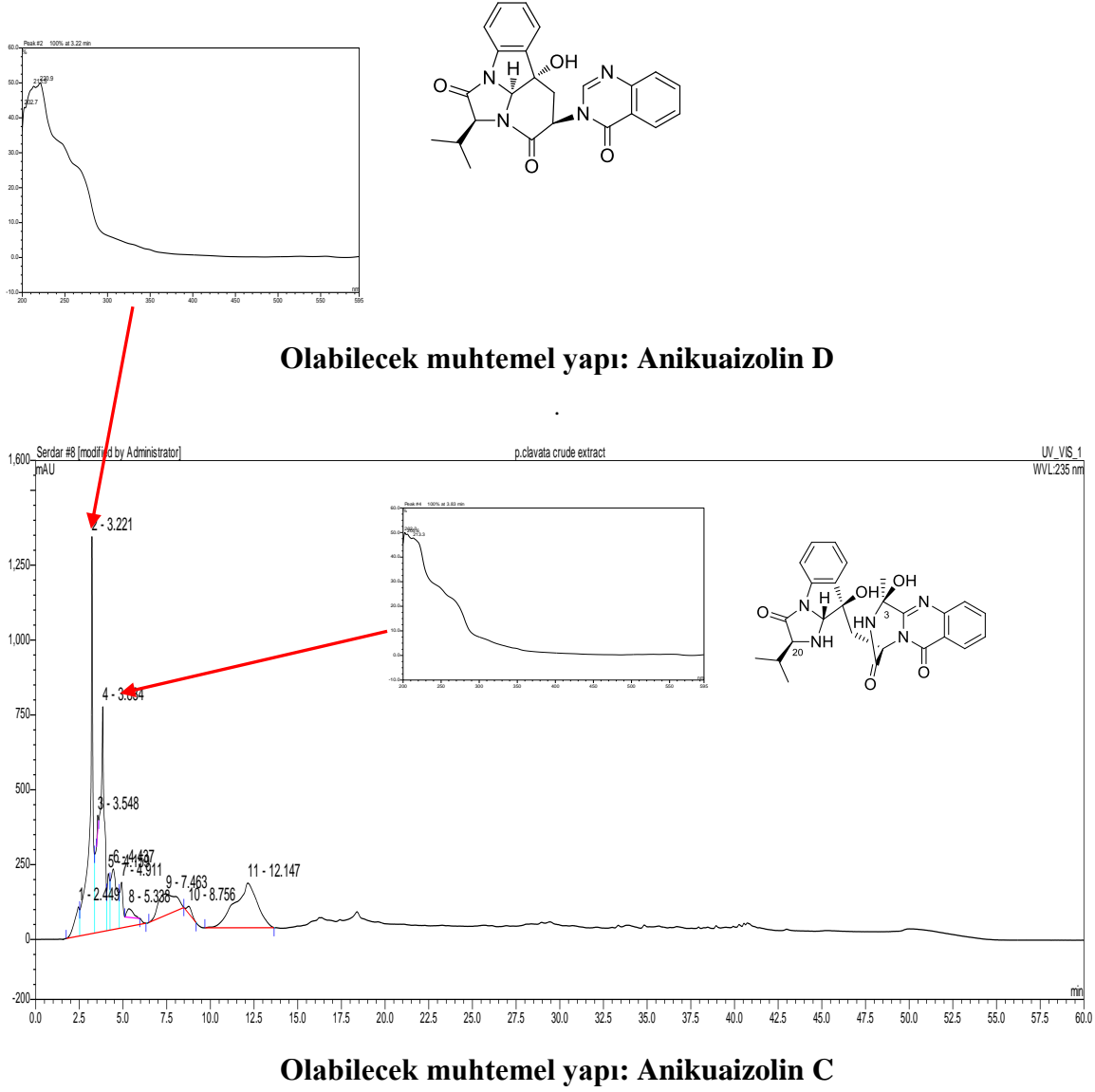
Olabilecek muhtemel yapı: Dioksiindol-paspalitrem C



Olabilecek muhtemel yapı: Papirasillik asit C

Şekil 5.18. 6 no'lu fraksiyonun etken maddeleri (39)

5.4.2.4. *Paramuricea clavata*'nın etanol ekstresinin etkili maddelerinin YSBK ile tespiti



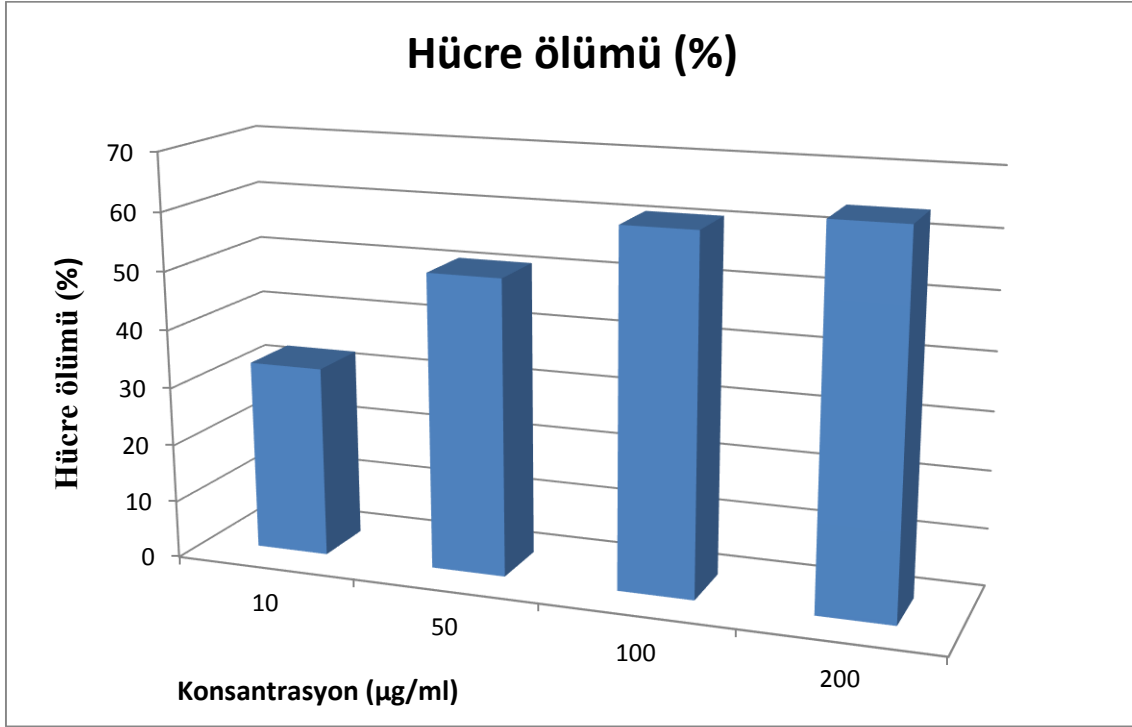
Şekil 5.19. Metanol: kloroform ekstrenin etken maddeleri (37).

5.5. Biyoaktivite Bulgular

5.5.1. Hep-2 hücrelerinde dizileri üzerinde sitotoksik etki incelemesi

Hep-2 hücrelerinde dizileri üzerinde sitotoksik etki sonucu *Paramuricea clavata*'dan hazırlanan metanol: kloroform (1:1) ekstrenin, MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil

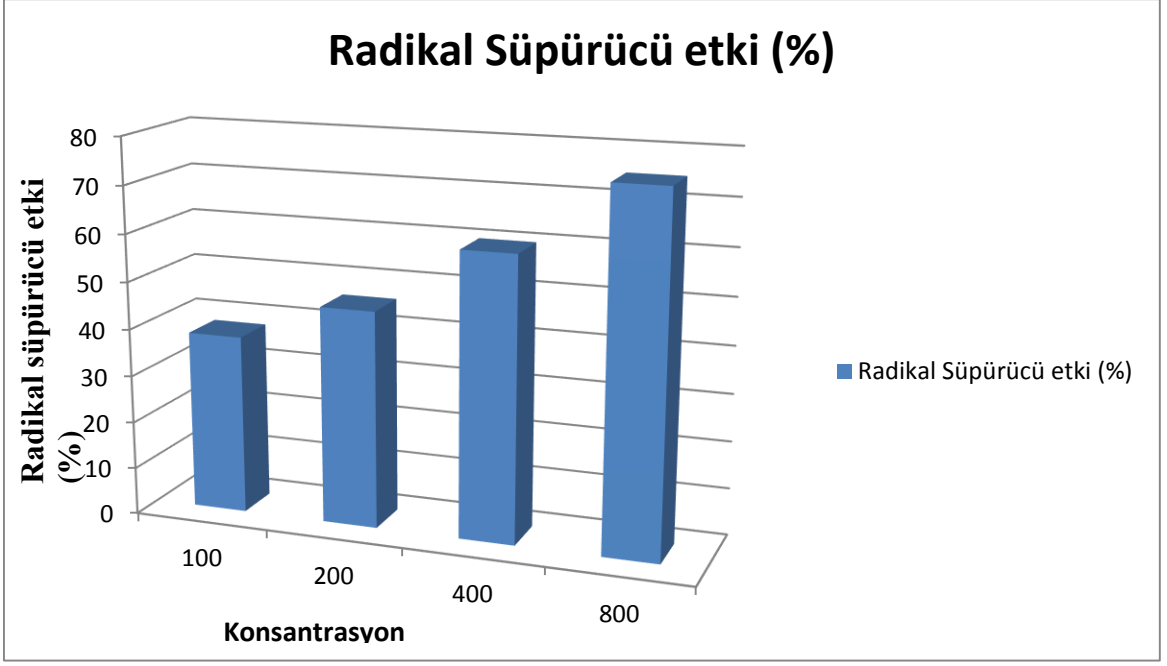
tetrazolyum bromür] ile sitotoksik aktivitesinin ölçümü sonucunda; hep-2 hücrelerini %34, %52, %61 ve %65 oranında inhibe ettiği görülmüştür.



Şekil 5.20. Hep-2 hücrelerinde dizileri üzerinde sitotoksik etki inceleme sonucu

5.5.2. Radikal süpürücü etki incelemesi

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikaline karşı antioksidan aktivite tayini amacıyla standart olarak askorbik asit (AA) ve kersetin kullanılmıştır. Çalışmada, kersetin 100, 200, 400 ve 800 µg/ml konsantrasyonlarındaki dilüsyonların aktiviteleri sırasıyla %87,6, %90,6; %93,09 olarak bulunmuştur. Askorbik asit (AA) dilüsyonlarının aktivitesi ise sırasıyla; %90,63; %92,90; %93,33 ve %93,58 değerleri elde edilmiştir. %5 altındaki inhibisyon yapanlar inaktif kabul edilmiştir. DPPH radikaline karşı aktivite tayini için, ekstrenin dört ayrı konsantrasyonda hazırlanan dilüsyonlarından antioksidan aktiviteleri aşağıdaki Şekil 5.21'de verilmiştir.



Şekil 5.21. Radikal Süpürücü Etkisinin İncelemesi

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Önceleri Knidlilerin habitatları açısından incelenmesi oldukça sınırlıydı, çünkü sığ ve gelgitlerde yerleşen Knidliler türlerine ulaşılması zordu. Fakat, skuba takımının gelişmesiyle birlikte araştırmacılar daha derin ve uzun dalma imkanları sayesinde Knidliler türlerini toplamakla birlikte daha derin denizlerdeki ulaşılammamış ve araştırılmamış olan deniz ekosistemlerini araştırma imkanını elde etmişlerdir (40). Bu gelişmekte olan teknikler bize yeni Knidliler türlerini bulmamızı sağlayacaktır. Bu organizmalar yaşadıkları bu habitatlara endemiktir ve bu olağanüstü habitatlara ve zorlu şartlara inanılmaz derecede adaptasyon sağlarlar (örn. kemosentetik deniz anemonları) (41). Bu türler yeni terapötik doğal ürünler için ilgi çekici adaylardır (42). İlaç geliştirilmesi için sığ kayalıklardan toplanan organizmalar kayalıklar ekosisteminin ekolojik proseslerini negatif olarak etkilemiştir. Bunun sonucunda derin deniz mercanları, yok olma tehlikesiyle ciddi manada karşı karşıya kalmışlardır.

Knidliler kaynaklarının yaşam tehlikelerine karşı alternatif olarak üretilmeleri için su kültürü çalışmaları yapılmaktadır. Vahşi ortam örneklerinin toplanmasının iki önemli darboğazı vardır; Sürdürülebilirlik ve Tekrarlanabilirlik (43). Sürdürülebilirlik konusu ilaç üretimi için büyük miktarda biyokütle gerekliliği ile ilişkilidir. Tekrarlanabilirlik ise çevresel çeşitlilik ve benzerlik düzeyi ile ilişkilidir (44).

Üç tarafı denizlerle kaplı olan Türkiye geniş deniz biyoçeşitliliğine sahiptir. Yeni ve komplike hastalıklar ortaya çıkmaya devam etmesiyle beraber yeni ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden yeni ilaç olanakları için Türkiye kaynaklarının da çok iyi araştırılması gerekmektedir. Türkiye omurgasızları henüz yeterince araştırılmamıştır. Yaptığımız literatür çalışmaları ve Türkiye kıyılarından topladığımız omurgasızların iki biyoaktivite (Sitotoksik ve Radikal süpürücü) testleri sonucunda mercan türü olan *Paramuricea clavata* ile çalışmaya karar verilmiştir. *Paramuricea clavata* ile ilgili literatüre göre çok az çalışma yapılmıştır. Bu zamana kadar izole edilmiş bileşikler içinde alkaloitler fazladır. Bunlar triptamine, serotonin, bufotenin, kafein, 2-Bromo-N-metiltriptamin, 3-Bromo tiramin, 6-Bromo-N-metiltriptamin, 1,3,7-trimetilisoguanin, N-metil triptamin, 6-hidroksitetrahydro-β-carbolin ve linderuzelendir.

Paramuricea clavata'da yapılan biyoaktivite çalışmalarında ise gerek mercan ekstresinde, gerekse izole edilen bileşiklerde antifouling, antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik aktiviteler bulunmuştur (32).

Bu çalışma, *Paramuricea clavata* ile ülkemizde yapılan ilk çalışmadır. İzole edilen madde olan β -sitosterol bugüne kadar bu türden izole edilmemiştir. İkinci izole edilmiş olan maddenin saflaştırma ve yapı tayini işlemlerine devam edilmektedir. β -Sitosterol bileşiği, hem tek başına hem diğer benzer fitosterollerle beraber kullanıldığında kandaki kolesterol seviyesini indirir ve bazen hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılır. Sitosterolün prostat büyümesi tedavisinde yararlı olduğu kanısı kesinlik kazanmamıştır (45). Avrupa ülkelerinde β -sitosterol prostat büyümesi tedavisinde kullanılmaktadır. YSBK ile karşılaştırma sonucu tayin edilen alkaloit Anikuaizolin A'nın ise bu türde bulunduğu dair bir kanıt yoktur. Anikuaizolin A-D, 2013 senesinde mangrov olan *Rhizophora stylosa*'dan elde edilen endofitik mantar olan *Aspergillus nidulans MA-143*'den izole edilmiştir (37). Kuinazolin 4-on grubu olan alkaloitlerden bu zamana kadar 160'dan fazla kuinazolinler bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalardan izole edilmiş olup, bu gruba ait alkaloitler sitotoksikite, anti-feedant, antimikrobiyal aktivite göstermektedir (46). Steroitler yumuşak mercanlarda, seski ve diterpenlerden sonra en çok kullanılan ikincil ürünlerdir. Son yıllarda özellikle endoperoksit steroller gösterdikleri antioksidan, antimikrobiyal, antitümör ve immunovaskülatör aktiviteleri nedeniyle önem kazanmıştır. Böylece bu doğal peroksitler, yeni ilaç modelleri için çok değerli kaynak olabilecektir. Anetol, monoterpen grubuna ait olup deniz kaynaklarında bulunduğu dair bir bilgiye rastlanmamıştır. Ancak, sitotoksik monoterpenler deniz alglerden izole edilmiştir (47). Papirasillik asit C literatür araştırmasında sadece bitkisel mantardan elde edildiği kayıtlıdır (48). On sene öncesine kadar yeni antibiyotik olarak kabul edilen etkili bu maddenin *Paramuricea clavata*'da tespit edilmiş olması ileride yapılacak çalışmalarda izole edilebilirse deniz kaynaklı mercanlardan ilk defa izole edilmiş olacaktır. Alkaloit olan Paspalitrem C, ilk olarak *Claviceps Paspali* cinsi mantardan elde edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, Paspalitrem C, *Cavendishia pubescens* türünden elde edilen endofitik mantar *Phomopsis sp.*'tan izole edilerek bulunan Paspalitrem C hastalıktan bitkilerin korunmasında rol oynadığı tespit edilmiştir (39). Bu bileşiğin de izole edilmesi halinde ilk olarak deniz canlılarından elde edilmiş olacaktır. Son olarak antrakinin bileşikleri bulunmuştur. Antrakininler fenolik bileşikler olup hem karasal hem de deniz canlılarından izole edilmiştir. *Ceratotheca triloba*'nın kök, gövde, çiçek ve yapraklarından bazı antrakinin

bileşikleri izole edilmiştir. Bunlar içersinden antrasenedion ve 1-hidroksi-4-metil antrakinin bileşikleri antibakteriyal, antioksidan ve insan topoizomeraz II enzimini durdurma aktivitelerinin olduğu saptanmıştır. *Petrosia sp.* süngerinden türetilmiş olan mantar *Aspergillus versicolor*'dan beş antrakinin bileşikleri izole edilmiştir (49). Bu bileşiklerden yeni bulunmuş olan heksahidroantronlardan tetrahidrobostrisin ve 1-deoksi tetrahidrobostrisin izole edilmiş olup *Staphylococcus aureus* türü bakterine karşı güçlü etki göstermiştir. Antrakinin bileşiklerinden biri olan Monodiktiokinon A (1,8-dihidroksi-2-metoksi-6-methilantrakinin) yeni antimikrobiyal bileşik olarak kullanıma sunulmuştur. Çalışmamızda bulunan antioksidan ve sitotoksik aktiviteye bu maddelerin katkısı olabilir (50). İleride yapılacak çalışmalarda izole edilen maddelerin etkileri araştırılması sonucunda kesin bir sonuca varabileceğiz.

KAYNAKLAR

1. AD M. Marine Pharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 1969;58:1–33.
2. Weinheimer A SR. The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate. methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla*. *Chem Coelenterates.* 1969;15(*Tetrahedron Lett*):5185–8.
3. DJ F. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 200AD;17:7–55.
4. GULLO V.P., MCALPINE J., LAM K.S., BAKER D. PF. Drug Discovery from Natural Products, *J. J IndMicrobiol Biotechnol.* 2006;33:523–31.
5. Rocha J, Peixe L, Gomes NCM C. Cnidarians as a Source of new Marine Bioactive compounds-An Overview of the last decade and Future steps for Bioprospecting. *MarDrugs.* 2011;9:1860–86.
6. Proksch P, Edrada R ER. Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;59:125–34.
7. Stierle A, Strobel G SD. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science (80-).* 1993;260:214–126.
8. Balanus, M. J., Kinghorn, A D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 2005;78:431–41.
9. Bergmann W FR. Contribution to the study of marine sponges. 32. The nucleosides of sponges. *J Org Chem.* 1951;16:981–7.
10. MarinLit. A marine literature database maintained by the Marine Chemistry Group. Univ Canterbury, Christchurch, New Zeal. 2007;
11. 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.
12. marinedrugs. p. <http://www.mdpi.com/journal/marinedrugs/md13010202>.
13. Appeltans W, Ahyong ST, Anderson G, Angel MV, Artois T B, N, Bamber R, Barber A, Batsch I BA. The magnitude of global marine species diversity. *Curr Biol.* 2012;22:2189–202.
14. Coll M, Piroddi C, Steenbeek J, Kaschner K, Lasram FBR AJ, Ballesteros E, Bianchi CN, Corbera J DT. The biodiversity of the Mediterranean Sea: estimates, patterns and threats. *PLoS One.* 2010;5:11842.
15. Demirsoy A. Yaşamın Temel Kuralları Omurgasızlar=Invertebrates-Böcekler Dışında. 2005. 205-320 p.

16. Fautin D. N. Personal communication by e-mail. 2011. p. University of Kansas, Lawrence, KS, USA.
17. Rocha J, Peixe L, Gomes NCM, Calado R. Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds - An overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Mar Drugs*. 2011;9(10):1860–86.
18. Blunt, J.W. and Munro MHG. No T. *Mar database*. 2012;(Department of Chemistry, University of Canterbury).
19. J M. *Secondary metabolism*. Oxford Sci Publ. 1987;
20. Teixeira. *Products Naturais Marinhos*. *Biol Mar*. 2009;443–71.
21. Moore RE SP. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. *Science* (80-). 1971;172:495–8.
22. Vieira EC, Gazzinelli G M-GM. No Titl. *Bioquímica Cel e Biol Mol São Paulo Ed Atheneu*. 2002;
23. Han C, Qi J, Shi X, Sakagami Y, Shibata T, Uchida K OM. Prostaglandins from a Zoanthid: Paclitaxel-Like Neurite- Degenerating and Microtubule-Stabilizing Activities. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70(706-711.).
24. Wilke DV, Jimenez PC, Araújo RM, Silva WMB, Pessoa ODL S, ER, Pessoa CO, Moraes MO, Skwarczynski M, Simerska P TI, LV C-L. Pro-apoptotic activity of lipidic α -amino acids isolated from *Protopalpythoa variabilis*. *Bioorg Med Chem*. 2010;18:7997–8004.
25. Jiménez C CP (1993). ^{13}C -nmr Assignments and Cytotoxicity Assessment of Zoanthoxanthin Alkaloids from Zoanthid Corals. *J Nat Prod*. 1993;56:9–14.
26. Turk T, Macek P SD. Inhibition of acetylcholinesterase by a pseudozoanthoxanthin-like compound isolated from the zoanthid *Parazoanthus axinellae*. *Toxicon*. 1995;33:133–42.
27. Fukuzawa S, Hayashi Y, Uemura D, Nagatsu A, Yamada K IY. The Isolation and Structures of Five New Alkaloids, Norzoanthamine, Norzoanthaminone, Cyclozoanthamine, Oxyzoanthamine and Epinozoanthamine Heterocycl. *Commun*. 1995;1:207–14.
28. Maia, L.F., De Oliveira, V.E., Oliveira, M.E.R., Reis, F.D. F, B.G., Edwards, H.G.M., De Oliveira LFC. Colour diversification in octocorals based on conjugated polyenes: A Raman spectroscopic view. *J Raman Spectrosc*. 2013;44:560–6.
29. Çınar ME, Yokeş MB, Açık Ş, Bakir AK. Checklist of Cnidaria and Ctenophora from the coasts of Turkey. 2014;677–97.
30. Van Ofwegen L. *Paramuricea clavata*(Risso, 1826). *World Regist Mar Species*. 2014;

31. Rocha J, Peixe L, Gomes NCM, Calado R, Teixeira, Skropeta D, et al. *Paramuricea clavata*(Risso, 1826). *Bioorg Med Chem*. 2009;5(Department of Chemistry, University of Canterbury):2189–202.
32. Thomas OP, Blache Y. Antifouling Properties of Simple Indole and Purine Alkaloids from the Mediterranean Gorgonian *Paramuricea clavata*. 2011;2304–8.
33. Island P, France M, Port-cros Î De, Harmelin J, Marinopoulos J. Population structure and partial mortality of the gorgonian *Paramuricea clavata* (Risso) in the North-Western Mediterranean. 1994;4(1):5–13.
34. Taylor P, Mistri M. Ecological observations on a population of the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata* Ecological observations on a population of the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*. 2009;(April 2015):37–41.
35. Xu F, Wu H, Wang X, Yang Y, Wang Y, Qian H, et al. RP-HPLC Characterization of Lupenone and β -Sitosterol in *Rhizoma Musae* and Evaluation of the Anti-Diabetic Activity of Lupenone in Diabetic Sprague-Dawley Rats. *Molecules* [Internet]. 2014;19(9):14114–27. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/9/14114/>
36. Chaturvedula VSP, Prakash I. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *Int Curr Pharm J*. 2012;1(9):239–42.
37. An CY, Li XM, Li CS, Wang MH, Xu GM, Wang BG. Aniquinazolines A-D, four new quinazolinone alkaloids from marine-derived endophytic fungus *aspergillus nidulans*. *Mar Drugs*. 2013;11(7):2682–94.
38. Irinder s. Parmar,* Subhash c. Jain, Kirpal s. Bisht, Rajni Jain, Poonam Taneja, Amitabh Jha, om d. Tyagi, Ashok k. Prasad,~ Jesper Wengel t CEO and PMB. *Phytochemistry of the Genus Piper*. *Phytochemistry*. 1997;46 (4):591–673.
39. Dorner JW, Cole RJ, Cox RH, Cunfer BM. Paspalitrem C, a new metabolite from sclerotia of *Claviceps paspali*. *J Agric Food Chem* [Internet]. 1984;32(5):1069–71. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00125a033>
40. Synnes M. Bioprospecting of organisms from the deep sea: Scientific and environmental aspects. *Clean Technol Environ Policy*. 2007;9:53–7.
41. Skropeta D. Deep-sea natural products. *Nat Prod Rep*. 2008;25:1131–66.
42. Kingston DGI. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *J Nat Prod*. 2010;74:496–511.
43. Council NR. *Marine Biotechnology in the Twenty-First Century: Problems, Promise and Products*. Natl Acad Press. 2012;
44. Hay M. Marine chemical ecology: what's known and what's next? *J Exp Mar Biol Ecol*. 1996;200:103–34.

45. MacDonald R, Ishani a., Rutks I, Wilt TJ. A systematic review of Cernilton for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *BJU Int.* 2000;85(7):836–41.
46. Li H, Ye J. Progress in the studies on cytomegalovirus retinitis. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 2003;25(2):223–7.
47. El Gamal A a. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm J* [Internet]. King Saud University; 2010;18(1):1–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2009.12.001>
48. Verma VC, Kharwar RN, Strobel G a. Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. *Nat Prod Commun.* 2009;4(11):1511–32.
49. Mohanlall V, Steenkamp P, Odhav B. Isolation and characterization of anthraquinone derivatives from *Ceratotheca triloba* (Bernh .) Hook . f . *J Med Plants Res.* 2011;5(14):3132–41.
50. El-Beih AA, Kawabata T, Koimaru K, Ohta T, Tsukamoto S. Monodictyquinone A: a new antimicrobial anthraquinone from a sea urchin-derived fungus *Monodictys* sp. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2007;55(7):1097–8.

ÖZGEÇMİŞ

Serdar Korpayev
Tel: +905063419819
e-mail: serdarkorpe@gmail.com
Cevizlidere mah. 1244. sokak no:14/1
Çankaya/ANKARA

EĞİTİM

- **Atamurat Özel Koleji, Atamurat, Lebap, Türkmenistan 2000-2005**
- **Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Kimya+Eğitim Tezsiz Yüksek lisans 2006-2013 Ocak**
- **Ankara Üniversitesi, Temel Biyoteknoloji, Yüksek Lisans 2014-**

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum tarihi 09.04.1988
Medeni durumu Evli
Askerlik Tamamlandı

DİL BİLGİLERİ

Türkmençe (Ana dil)
Türkçe (İyi)
Rusça (Orta)
İngilizce (İyi)

BİLGİSAYAR BİLGİLERİ

Microsoft Windows
Microsoft Office

İŞ DENEYİMLERİ

Ankara Üniversite Eczacılık fakültesi Proje Çalışanı Eylül, 2014-

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

- Deniz Antikanser etkili bileşikleri (Yüksek Lisans Semineri)
- Good Practice in Traditional Chinese Medicine Research Association, The Fourth Annual Meeting in Mons in 2015. 13-15 July 2015 Kongresinde Poster sunumu



SUPEROXIDE RADICAL SCAVENGING AND CYTOTOXIC EFFECTS OF DIFFERENT MARINE SPECIES FROM TURKEY'S COASTS



Secil Sarıkaya Aydın¹, Yasin Genç¹, Melek Sertdemir², Serdar Korpayev², Bülent Gözcelioğlu³, Belma Konuklugil⁴, U. Sebnem Harput¹

¹Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100 Sıhhiye, Ankara, Turkey; ²Biotechnology Institute, Ankara University, 06100, Tandoğan, Ankara, Turkey; ³Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK), Turus Caddesi No: 80, Kavaklıdere, Ankara; ⁴ Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Ankara University, 06100, Tandoğan, Ankara, Turkey

ABSTRACT

In this study, acetone extracts of thirteen different species distributed in Turkey Coasts including tunicates, sea anemones, sponges and corals were investigated for their superoxide (SO) radical scavenging and cytotoxic activities. While SO radical scavenging activity was tested using alkaline DMSO method, cytotoxic activity was tested by MTT assay against Hep-2 cancer cell line. As a result of bioactivity studies, *Paramuricea clavata* extract showed the strongest scavenging activity (IC₅₀=296.81 µg/mL) and extracts of *Parazoanthus axinellae*, *Halocynthia papillosa*, *Eunicella cavolini* and *Dictyonella incisa* showed moderate activity comparing to that of ascorbic acid and quercetin. However, other extracts did not show any SO radical scavenging activity in tested concentrations. In the case of cytotoxic activity, only *Paramuricea clavata* extract showed dose dependent cytotoxic activity (IC₅₀=58.71 µg/mL).

INTRODUCTION

Cancer is the most important disease in last decades although there have been important developments in cancer therapeutics (Schumacher et al., 2011). Medicinal plants, animals, marine organisms and microorganisms have different secondary metabolites, and these metabolites have many activities such as anti-inflammatory, antitumoral, antioxidant, etc. There are many chemotherapeutic agents in cancer therapy obtained from natural sources (Rocha et al., 2001). More than 3000 new compounds have been isolated and their structures determined from marine organisms so far and some of them used in cancer therapy (Rocha et al., 2001). In this study, acetone extracts of thirteen marine organism species collected from Turkey's coasts have investigated of their SO radical scavenging activity and cytotoxic activity in Hep-2 cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Materials:

Different marine species including tunicates, sea anemones, sponges and corals were collected from Turkey Coasts. Their localities are given in the table below.

Species name	Locality	Kind
<i>Haliciona aqueductus</i>	Gölcük	Sponge
<i>Anemonia sulcata</i>	Keşan	Coral
<i>Paramuricea clavata</i>	Ayvalık	Coral
<i>Parazoanthus axinellae</i>	Keşan	Coral
<i>Halocynthia papillosa</i>	Keşan	Tunicate
<i>Styela clava</i>	Gölcük	Tunicate
<i>Cladocora caespitosa</i>	Ayvalık	Coral
<i>Derianthus membranaceus</i>	Ayvalık	Sea anemone
<i>Eunicella cavolini</i>	Ayvalık	Coral
<i>Dictyonella incisa</i>	Befertişar	Sponge
<i>Ascidellea aspera</i>	Gölcük	Tunicate
<i>Actinia equina</i>	Zonguldak	Coral
<i>Aplysisa digitata</i>	Ayvalık	Sponge

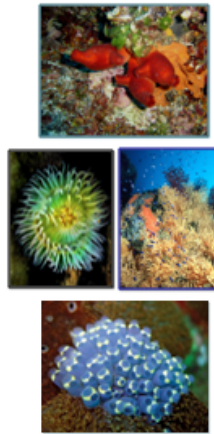


Table 1. Marine species; sponges, corals, tunicates and sea anemone

EXTRACTION METHOD



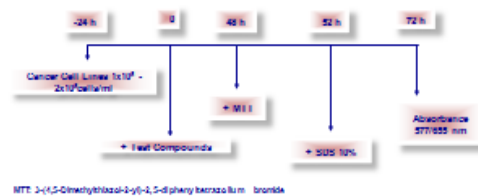
References

- Schumacher, M., Kekel, M., Dicks, M., Diederich, M. A survey of marine natural compound and their derivatives with anti-cancer activity reported in 2010. *Molecules* 16, 3622-3646 (2011).
- Rocha, A.B., Lopes, L.M., Schwartmann, G. Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 1, 284-289 (2001).

Superoxide Radical Scavenging Activity Method



CYTOTOXIC ACTIVITY METHOD (MTT)



RESULTS

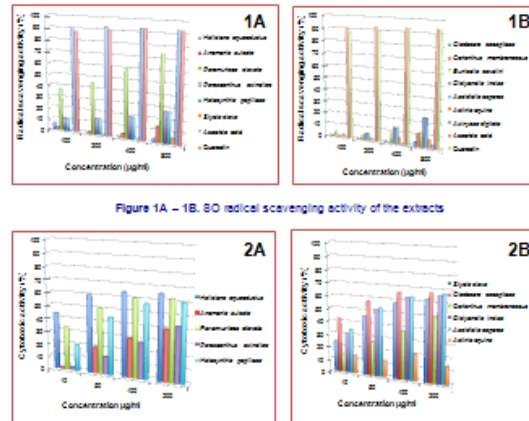


Figure 1A – 1B. SO radical scavenging activity of the extracts

Figure 2A - 2B. Cytotoxic activity of the extracts in Hep-2 cells

CONCLUSIONS

- Paramuricea clavata* extract showed the strongest SO radical scavenging activity (IC₅₀=296.81 µg/mL).
- Extracts of *Parazoanthus axinellae*, *Halocynthia papillosa*, *Eunicella cavolini* and *Dictyonella incisa* showed moderate SO radical scavenging activity comparing to that of ascorbic acid and quercetin.
- Other extracts did not show any SO radical scavenging activity in tested concentrations.
- Haliciona aqueductus*, *Cladocora caespitosa*, *Paramuricea clavata* extracts showed dose dependent cytotoxic activity (IC₅₀ values=31.53, 32.98, 58.71 µg/mL).
- Since *Paramuricea clavata* extract showed both SO radical scavenging and cytotoxic activity, isolation studies to obtain pure and active compounds will be continued on this extract.

	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>Haliciona aqueductus</i>	31.53
<i>Anemonia sulcata</i>	50.99
<i>Paramuricea clavata</i>	58.71
<i>Parazoanthus axinellae</i>	223.30
<i>Halocynthia papillosa</i>	75.36
<i>Styela clava</i>	72.65
<i>Cladocora caespitosa</i>	32.98
<i>Derianthus membranaceus</i>	144.94
<i>Dictyonella incisa</i>	57.09
<i>Ascidellea aspera</i>	54.14
<i>Actinia equina</i>	463.02

Table 2. Cytotoxic activity of acetone extracts in Hep-2 cells