

Araştırma Makalesi

Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg 2020;13(1):24-34

doi: 10.26559/mersinsbd.546896

Matrin ve oksimatrinin mikrobiyal transformasyonu ve metabolitlerinin *in vitro* biyolojik aktivitelerinin incelenmesi

Ayşe Esra Karadağ¹, Fatih Demirci²

¹İstanbul Medipol Üniv., Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, İstanbul

²Anadolu Üniv., Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Eskişehir

Öz

Amaç: Matrin ve oksimatrin bileşiklerinin mikrobiyal transformasyon yolu ile metabolitlerin karşılaştırmalı olarak biyolojik aktivitelerinin incelenmesi hedeflenmiştir. **Yöntem:** 30 farklı mikroorganizmanın sıvı besiyerinde üretilmesinden sonra, substratların ayrı ayrı ortama eklenerek yeni maddelere dönüşümü gözlemlenmiştir. Üretilen yeni maddeler besiyerinden uygun koşullarda ekstre edilerek, İnce Tabaka Kromatografisi ile maddelerin varlığı tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Escherichia coli* NLL B-3008, *Streptococcus epidermidis* ATCC 14990, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Helicobacter pylori* ATCC 43504 ve *Candida albicans* ATCC 90028 mikroorganizmalarına karşı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu Ellman metodu ile araştırılmıştır. 5-lipooksijenaz enzim inhibisyonu deneyleri ise kolorimetrik yöntemle belirlenmiştir. **Bulgular:** Matrin substratından *Mucor ramannianus* ve *Enterococcus faecalis* ile mikrobiyal biyotransformasyon sonucu iki metabolit (M1 ve M2) oluşmuştur. Oksimatrin substratının beş farklı mikroorganizma ile biyotransformasyonu sonucu matrin metabolit olarak elde edilmiştir. **Sonuç:** Matrin, oksimatrin, M1 ve M2 metabolitlerinin antimikrobiyal açıdan etkili olmadığı tespit edilmiştir. Matrin (%10.47), oksimatrin (%21.11), M1 (%24.23) ve M2 (%26.42)'nin 5-LOX enzim inhibisyonu açısından standart NDGA (%96.35) ile kıyaslandığında orta düzeyde aktivite gösterdiği görülmüştür. Asetilkolinesteraz/bütirikolinesteraz enzim inhibisyonu matrin (%34.16/ %20.49), oksimatrin (%23.68/ %22.76), M1 (%27.72/ %22.05) ve M2 (%30.63/ %23.98) açısından değerlendirildiğinde ise metabolitlerde az da olsa aktivitede artış gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyotransformasyon, kolinesteraz, lipooksijenaz, matrin, oksimatrin

Yazının geliş tarihi: 29.03.2019

Yazının kabul tarihi: 10.02.2020

Sorumlu yazar: Ayşe Esra Karadağ, İstanbul Medipol Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Beykoz, İstanbul, Türkiye.

Tel: 0 216 681 51 00

E-posta: ayseesraguler@gmail.com

Not: Bu çalışma "Matrin ve Oksimatrinin Mikrobiyal Transformasyonu ve Metabolitlerinin Kolinesteraz İnhibisyonu" adlı bir yüksek lisans tez çalışmasının bir çıktısı olup, 2017 yılında Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanmıştır.

Microbial transformations of matrine and oxymatrine and *in vitro* biological evaluation of metabolites

Abstract

Aim: It is aimed to examine the comparative biological activities of metabolites of matrine and oxymatrine compounds which were obtained by microbial transformation. **Methods:** After the cultivation of 30 different microorganisms in liquid medium, the transformation of substrates to new media was observed by adding them separately. The metabolites were initially identified by thin layer chromatography. Antimicrobial activity was investigated by microdilution method against microorganisms of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Escherichia coli* NRLL B-3008, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Helicobacter pylori* ATCC 43504, *Streptococcus epidermidis* ATCC 14990, and *Candida albicans* ATCC 90028. The acetylcholinesterase enzyme inhibition was investigated by Ellman's method. 5-lipoxygenase enzyme inhibition experiments were determined by Baylac's colorimetric method. **Results:** The biotransformation of the matrine with *Mucor ramannianus* and *Enterococcus faecalis* resulted in two metabolites (M1 and M2). Matrine was obtained as a metabolite by the biotransformation of oxymatrine with 5 different microorganisms. **Conclusion:** Matrine, oxymatrine, M1 and M2 metabolites were not effective for antimicrobial activity. Matrine (10.47%), oxymatrine (21.11%), M1 (24.23%) and M2 (26.42%) metabolites showed moderate activity compared to standard NDGA (96.35%) for 5-lipoxygenase enzyme inhibition. When acetylcholinesterase/ butyrylcholinesterase enzyme inhibitions are evaluated in terms of matrine (34,16%/ 20,49%), oxymatrine (23.68%/ 22.76%), M1 (27.72%/ 22.05%) and M2 (30.63%/23.98%) however, a slight increase in activity was observed in metabolites.

Keywords: Biotransformation, cholinesterase, lipoxygenase, matrine, oxymatrine

Giriş

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

Mikroorganizmalar, sahip oldukları enzim sistemleri ile substratlara etki ederek buldukları ortamda çeşitli dönüşümlerin gerçekleşmesine imkân sağlamaktadır. Aktif halde bulunan suşların, sıvı besiyerlerinde

substratla etkileşmesi sonucu elde edilecek metabolitler, substrattan daha aktif ve daha az toksik maddeler olabilmektedir. Mikrobiyal transformasyon yöntemi ile doğal maddelerden yola çıkarak üretilen yeni bileşikler de doğal bileşikler olarak kabul görmektedir.¹

Çalışmada substrat olarak kullanılan maddeler olan matrin ve oksimatrin, doğal olarak *Sophora* türlerinin köklerinden izole edilebilmektedirler.² Bu maddeler kinolizidin alkaloidleri yapısında olup, çeşitli biyolojik ve farmakolojik etkilere sahiptirler.³ Sedatif, inotropik, antipiretik, antitümör etkileri ve Hepatit B üzerinde aktiviteleri kaydedilmiştir.⁴⁻¹⁰ Bunun yanı sıra matrinin κ -opioid reseptörü ve μ -reseptör agonisti olduğu ve antinöroseptif aktivitesi olduğu bilinmektedir.¹¹⁻¹² Klinik olarak oksimatrinin matrinden daha aktif olduğu bilinmektedir. Oksimatrinin kalp aritmilerini düzenlediği çalışmalarda kayıtlıdır. Matrin, antiinflamatuvar etkili bileşiklerle kombine edildiğinde ekzama, psöriazis ve nörodermatitte

kullanılmaktadır.^{6, 13} Kanser çalışmalarında oldukça sık çalışılmış bileşiklerden olan oksimatrinin kardiyak aritmilerde ve bazı kalp rahatsızlıklarında incelendiği bilinmektedir.¹⁴ Çin'de bir geleneksel tıbbi ilaç olarak oldukça yaygın olarak tanınan *Sophora flavescens* A., sıcak suda ekstresi hazırlanmak suretiyle antiviral etkisinden ötürü kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda da bitki içerisinde yer alan oksimatrinin, güçlü antiviral etkisinin olduğu ortaya konulmuştur.¹⁵⁻¹⁶ Viral Hepatit C'de oksimatrin ile olumlu sonuçlar alınmıştır. Oksimatrin, daha toksik bir metaboliti olan matrine kolaylıkla dönüşebilmektedir. Bu dönüşüm karaciğer mikrozomal enzimleri (HLMs), bağırsak enzimleri (HIMs) ve CYP4 ile kolaylıkla gerçekleşmektedir.¹⁷ Matrin ve oksimatrin bileşiklerinin her ikisi daha çok antikanser aktivite çalışmalarına konu olmuş ve çeşitli hücre hatları üzerinde başarılı sonuçlar alınmıştır.¹⁸⁻²²

Bu çalışmanın amacı; alkaloit yapısındaki matrin ve oksimatrin substratlarından biyotransformasyon ile elde edilecek yeni metabolitlerin tanımlanması ve substrat/metabolit biyoaktivitelerinin *in vitro* kolinesteraz inhibisyonu, 5-LOX enzim inhibisyonu ve antimikrobiyal etki (Gram-pozitif ve negatif bakteri, *Candida*, *Helicobacter*) açısından karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesidir.

Yapılan kaynak araştırmasında matrin ile yapılmış fungus veya bakterilerin bütün hücre sistemleri olarak kullanılmasıyla gerçekleşen biyotransformasyon çalışmasına rastlanmazken, oksimatrinin bir takım mikroorganizmalarla biyotransformasyonunu konu alan bir yüksek lisans tezi mevcuttur.²³ Bu tezde *Penicillium chrysogenum* (ATCC 9480), *Cunninghamella blakesleena* (ATCC 9245 ve 8688A), *Cunninghamella bainieri* (ATCC 9244), *Curvularia lunata* (ATCC 12017) ve *Fusarium sp.* ile oksimatrinin matrine dönüşümü gerçekleştirilmiştir.

Yöntem

Kullanılan mikroorganizmaların izole edildikleri/ satın alındıkları kaynaklar Tablo 1'de belirtilmiştir.

Biyotransformasyon Deneyleri

Biyotransformasyon çalışmaları ön tarama deneyleri ve preparatif biyotransformasyon olmak üzere iki aşamada gerçekleşmiştir. İlk aşamada 30 mikroorganizma içinden substrat molekülü matrin ve oksimatrin ile etkin ve verimli dönüşümler gerçekleştiren mikroorganizmalar ön tarama deneyleriyle belirlenmiş ve ikinci aşamada büyük ölçekli biyotransformasyonla elde edilen metabolitler İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile tespit edilmiştir.

Tüm biyotransformasyon çalışmalarında metabolitlerin mikrobiyal transformasyon ürünleri olup olmadığını anlamak amacıyla, aynı koşullarda hazırlanmış ve besi yeri; besi yeri + mikroorganizma bulunduran iki erlen kontrol amaçlı kullanılmıştır. Bir öze dolusu mikroorganizma aseptik koşullarda uygun katı besiyeri içeren petrilere inoküle edilmiş, fungus ve mayalar için 26-28 °C, 24-72 saat; bakteriler için 37 °C, 24 saat olan inkübasyon şartlarında petrilere gelişime bırakılmıştır. Bu süre sonunda gelişen mikroorganizmalar, 250 mL erlenler içinde bulunan 100 mL steril zenginleştirilmiş sıvı besiyerine (α -medyum) aktarılmıştır. Aşılardan erlenler uygun sıcaklıklarda 160 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 48 saat boyunca ön inkübasyona bırakılmıştır. Erlenlerden biri mikroorganizma kontrolü olarak kullanılırken, diğerine 3-5 mg substrat steril şartlarda steril su içerisinde çözüldürüldükten sonra ilave edilmiştir. İki erlen kontrol amaçlı kullanılmak üzere diğer erlenlerle birlikte çalkalamalı inkübatörde 15 günlük inkübasyona bırakılmıştır.

Biyotransformasyonun 1., 3., 5., 7., 9., 11. ve 13. günlerinde metabolit oluşumunu kontrol etmek amacıyla ekstraksiyon yapılmıştır. Bu amaçla steril şartlarda erlenlerden 3 mL besiyeri içeriği alınarak deney tüplerine aktarılmıştır. Deney tüplerine 3 mL kloroform ilave edilmiş ve deney tüpleri bir dakika kadar vortekslenmiştir. Ardından bir müddet bekletilmiş ve berrak faz pipetle diğer bir deney tüpüne aktarılmıştır. Bu işlem her erlen için üç defa tekrarlanarak ekstraksiyon

işlemi gerçekleştirilmiştir. Kloroform vakumlu hızlı yoğunlaştırıcı kullanılarak ekstreden uzaklaştırılmıştır. Ekstrede metabolit oluşumu İTK sistemiyle kontrol edilmiştir. İTK plakları UV ışık altında 254/364 nm dalga boyunda incelenmiş, oluşan metabolitler işaretlenmiş, UV altında ışınması olmayan metabolitleri tespit etmek amacıyla ise Dragendorff reaktifi ile

muamale edilmiştir. Hem UV lambası altında işaretlenen hem Dragendorff reaktifiyle renklendirilen spotlara bakılarak değerlendirme yapılmıştır. Buna göre, ekstrenin ve kontrol gruplarının oluşturduğu spotlar karşılaştırılmış, kontrol gruplarından farklı olan spotlar metabolit olarak düşünülmüştür.

Tablo 1. Biyotransformasyonda kullanılan mikroorganizmalar

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

5-LOX Enzim İnhibisyonu

5-LOX enzim inhibisyonu, Baylac ve Racine tarafından geliştirilen modifiye spektrofotometrik metot ile uygulanmıştır.²⁴ Lipoksijenaz enzimi (1.13.11.12, type I-B, Soybean), linoleik asit ve test maddeleri Sigma (St. Louis, MO, USA)'dan alınmıştır.

Potasyum fosfat tampon (1,94 mL; 100 mM; pH 9,0), 40 µL test maddesi solüsyonu ve 20 µL lipoksijenaz enzim solüsyonu hazırlanarak ve 25 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra reaksiyona 50 µL linoleik asit solüsyonu eklenerek 243 nm'de 20. dakikadaki absorbans değişimi ölçülmüştür. Test maddeleri ve pozitif

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

Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu

Substrat ve metabolitlerin asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE) enzim inhibisyon aktiviteleri Ellman metodu ile araştırılmıştır.²⁵ Yöntemin her aşamasında Milipor, Milli-Q Synthesis A10 saflaştırma cihazından elde edilen distile su kullanılmıştır. Kullanılan bütün çözeltilerin taze hazırlanmasına ve hazırlandıktan sonra bir hafta içerisinde tüketilmesine özen gösterilmiştir. Enzim inhibisyon çalışmasında hazırlanan çözeltilerin porsiyonlar halinde ayrılması, test bileşiklerinin 96 kuyucuklu plakalara uygulanması, enzim substrat çözeltilerinin ilave edilmesi işlemlerinde BioTek-Precision Power pipetleme sisteminden yararlanılmıştır. Enzim protokolünün oluşturulması, izlenmesi ve spektrofotometrik ölçümlerin alınması işlemleri, BioTek-Synergy H1 Microplate Reader cihazında yapılmıştır.

AChE ve BChE enzim çözeltilerinin hazırlanması: Liyofilize haldeki AChE/BChE enzimini çözmek için %1'lik jelatin çözeltisi hazırlanmıştır. AChE/BChE enzimi jelatin çözeltisinde 500 U/mL derişimde hazırlanmıştır. Enzim çözeltilerinden 1 mL alınarak balon joje içerisinde hacim suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır. Böylelikle 5 U/mL'ye seyreltilmiş stok enzim solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti 0.7 mL'lik porsiyonlar halinde -20°C'de saklanmıştır. Enzim çözeltileri, aktivite çalışmalarına başlamadan önce oda ısısına getirilmiş ve metod derişimi olan 2.5U/mL'ye seyreltmek için suyla 1.4 mL'ye tamamlanarak kullanılmıştır.

Asetiltiyokolin iyodür (ATCI) çözeltilerinin hazırlanması (0.075 M): ATCI (0.217 g) bir miktar suda çözülmüş ardından suyla 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan

çözelti, kullanılıncaya kadar 0.4 mL'lik kısımlar halinde -20 °C'de saklanmıştır.

Bütiriltiyokolin iyodür (BTCI) çözeltilerinin hazırlanması (0.075 M): BTCI (0.237 g) bir miktar suda çözülmüş ardından suyla 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti, kullanılıncaya kadar 0.4 mL'lik kısımlar halinde -20°C'de saklanmıştır.

5-5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) solüsyonunun hazırlanması (0.01 M): DTNB (0.396 g) tartılarak bir miktar suda çözülmüştür. Bu çözeltiye sodyum bikarbonat (0.15 g) ilave edilmiş ve hacim suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti, kullanılıncaya kadar 3 mL'lik kısımlar halinde -20 °C'de saklanmıştır.

Fosfat tamponunun hazırlanması (pH=8,0): Potasyum dihidrojen fosfat (13.61 g), 1 L suda çözülmüştür. Hazırlanan çözeltilerin pH'sı 0,1 N potasyum hidroksit çözeltisi ile pH metre kullanılarak kontrollü biçimde 8.0+0.1'e ayarlanmıştır. Ayarlı tampon çözelti 0.22 µm por çapı olan tek kullanımlık filtrelerden süzülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan çözelti, kullanılıncaya kadar 4°C'de saklanmıştır.

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

AChE ve BChE inhibisyon çalışması: Elde edilen bileşiklerin enzim inhibisyon aktiviteleri, öncelikle ön tarama niteliğinde olan 10^{-3} ve 10^{-4} M'lik iki derişimde gerçekleştirilmiştir. Aktivite değerleri %0-100 aralığında inhibisyon şeklinde değerlendirilmiştir. Bileşiklerin 10^{-4} M derişimde %50 ve daha fazla değerde inhibisyon görüldüğü takdirde, 10^{-9} M derişime kadar alt derişimlerde inhibisyon oranları araştırılmıştır.

Çalışmalarda 96 kuyucuklu plaklar kullanılmıştır. Her bir hücrede 140 µL fosfat tamponu, 20 µL enzim solüsyonu, 20 µL inhibitör çözelti, 20 µL DTNB çözeltisi, 10 µL ATCI/BTCI çözeltisi olacak şekilde toplam

210 µL hacme ulaşılmıştır. Çözeltiler, 96 kuyucuğa yetecek miktarlarda iki farklı test çözeltisi meydana getirecek şekilde karıştırılmıştır. Birinci test çözeltisi; bir kuyucuk için 70 µL fosfat tamponu, 20 µL enzim çözeltisi ve 20 µL DTNB çözeltisi, ikinci çözelti ise; bir kuyucuk için 70 µL fosfat tamponu ve 10 µL ATCI/BTCI çözeltisi içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Öncelikle birinci test çözeltisi ve farklı derişimlerdeki inhibitör bileşigi çözeltileri (20 µL), 96 kuyucuklu plakalara Biotek Precision XS robotik sistemi kullanılarak eklenmiştir. İnhibitör bileşiklerinin her derişimi plaklara dört tekrarlı olarak uygulanmıştır. Plakalar, BioTek-Synergy H1 mikropilaka okuyucusuna konarak önce beş dakika süreyle karıştırılmış daha sonra 25 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde mikropilaka okuyucusu dispenser haznesinde bulunan ikinci test çözeltisinin her bir kuyucuğa 80 µL olacak şekilde ilavesi sağlanmıştır. İkinci test çözeltisi eklendikten sonra 30 saniyelik hızlı bir karıştırma işlemi yapılmıştır. Bu aşamada 412 nm'de birinci absorbands okuması gerçekleştirilmiştir. Mikropilakalar, reaksiyonun sürmesi için beş dakika daha karışmaya bırakılmış ve bu süre sonunda ikinci absorbands okuması yapılmıştır.

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

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

B: Blank (İnhibitör bileşik ve substratın eklenmediği kuyucuk)

K: Kontrol (Sadece inhibitör bileşigin eklenmediği kuyucuk)

A(B): Blank kuyucuğuna ait absorbands okuma farkı

A(K): Kontrol kuyucuğuna ait absorbands okuma farkı

A(I): İnhibitör maddelere ait absorbands okuma farkı

Bileşiklerin IC₅₀ değerleri Graphad Prism (Graphad Software, San Diego, CA,

USA) programında non-linear regresyon analizinin sigmoid doz-yanıt modeli kullanılarak çizilen inhibisyon eğrilerinden hesaplanmıştır.

Antimikrobiyal Aktivite

Ekstrenin mikroorganizmalara karşı CLSI (Clinical & Laboratory Standarts Institue) belirlediği standartlar doğrultusunda minimum inhibisyon derişimi (MİK) değerleri saptanmıştır. Standart antimikrobiyal olarak kloramfenikol, tetrasiklin, streptomisin, klaritromisin ve amikasin kullanılmıştır. Bu amaçla 96 kuyucuklu steril plaklar kullanılmıştır. Ekstre için plağın ilk sütunu kullanılmış ve bir sütun besiyeri kontrolü, diğer bir sütun ise üreme kontrolü olarak ayrılmıştır. Kullanılan bu kuyucukların hepsine Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerinden 100'er µL eklenmiştir. İlk kuyucuğa ekstrenin başlangıç derişimini içeren çözeltisinden 100 µL eklenmiştir. Test edilecek en yüksek madde derişiminin eklendiği ilk kuyucuktan 100 µL alınıp maddenin çift kat seri dilüsyonları yapılmıştır.

Test edilecek bakteri kolonilerinden McFarland No: 0.5 türbidometrik olarak eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyon, 1/10 oranında yine MHB ile seyreltilerek, son bakteri inokulum derişimi 5 x 10⁵ CFU/mL olacak şekilde üreme kontrol kuyucuğu da dahil olmak üzere her bir kuyucuğa 5 µL eklenmiştir. Daha sonra plakların üzeri steril kapaklar ile kapatılmış ve 35°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından MİK değerleri görsel olarak değerlendirilmiş ve üreme görülmeyen en düşük derişimi çalışılan mikroorganizma için MİK değeri olarak belirlenmiştir. Daha sonra üreme kontrol reaktifi olarak hazırlanan %0.01'lik resazurin reaktifi her kuyucuğa 20 µL olacak şekilde pipetlenmiş ve plağın üstü kapatılarak iki saat daha 35± 2 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası plaklar tekrar değerlendirilmiş, indikatör olarak üreme olan kuyucuklar pembe, üreme olmayan kuyucuklar mavi renkte gözlenmiştir. Mavi renkte gözlenen en düşük derişim test edilen mikroorganizma

için o antimikrobiyal numunenin MİK değeri olarak belirlenmiştir.²⁶⁻²⁷

Bulgular

Biyotransformasyon Çalışmaları

Matrin ve oksimatrin 30 farklı bakteri, maya ve fungus kullanılarak mikrobiyal biyotransformasyonu sonucu matrin substratından *Mucor ramannianus* ve *Enterococcus faecalis* ile biyotransformasyonu sonucu yeni 2 metabolit (M1 ve M2) oluşmuştur. Oksimatrin substratı ile beş farklı mikroorganizma ile biyotransformasyonu sonucu matrin metabolit olarak elde edilmiştir.

5-LOX Enzim İnhibisyonu

Matrin, oksimatrin ve metabolitlerinin lipooksijenaz enzim inhibisyonu karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Substrat ve metabolitlerin etkinliklerine bakıldığında enzim inhibisyonu açısından önemli bir değişiklik saptanmamıştır. Matrin (%10.47), oksimatrin (%21.11), M1 (%24.23) ve M2 (%26.42) metabolitlerinin 5-LOX enzim inhibisyonu açısından standart NDGA (%96.35) ile kıyaslandığında orta seviyede bir aktivite gösterdiği görülmüştür (Tablo 2).

Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu

Ellman metodu ile gerçekleştirilen kolinesteraz inhibisyonu deneylerinde substrat maddeler olan matrin ve oksimatrinin biyotransformasyon sonucu oluşan metabolitleri ile butirilkolinesteraz ve asetilkolinesteraz inhibisyonları kıyaslamalı olarak incelenmiştir. Bu deneyler sonucunda substratlar ile metabolitlerin kolinesteraz inhibisyonları arasında ciddi bir fark olmadığı, ancak metabolitlerin substratlara göre çok az daha yüksek inhibisyona yol açtığı görülmüştür. Asetilkolinesteraz/bütirilkolinesteraz enzim

inhibisyonu matrin (%34.1/ %20.49), oksimatrin (%23.68/ %22.76), M1 (%27.72/ %22.05) ve M2 (%30.63/ %23.98) açısından değerlendirildiğinde ise metabolitlerde az da olsa aktivitede artış gözlemlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 2. Numunelerin % inhibisyon değerleri (mg/mL) (Lipoksijenaz enzim inhibisyonu aktivitesi standart madde (NDGA) derişim aralığı: 1 mg/mL – 0.05 mg/mL, test numunelerinin derişimi: 4 mg/mL)

Numuneler	% İnhibisyon
Matrin	10.47
Oksimatrin	21.11
M1	24.23
M2	26.42
NDGA	96.35

Antimikrobiyal Aktivite

Yapılan antimikrobiyal aktivite deneylerinde substratların ve metabolitlerin kullanılan mikroorganizmalara karşı denenen derişimlerde antimikrobiyal etkinliğinin olmadığı saptanmıştır (Tablo 4).

Tartışma

Yapılan kaynak taramaları sonucunda daha önce herhangi bir mikrobiyal transformasyon çalışmasında substrat olarak kullanılmayan ve antimikrobiyal, antiinflamatuvar, kolinesteraz inhibisyonu aktivite gibi biyolojik etkileri araştırılmamış olan matrin ve oksimatrininin Tablo 1'deki 30 farklı mikroorganizma ile biyotransformasyonu denemiş, oluşan metabolitler İTK yöntemiyle tanımlanmıştır.

Tablo 3. Numunelerin kolinesteraz % inhibisyon değerleri (250 µg/mL derişim)

Test numunesi	BChE % İnhibisyon	AChE % İnhibisyon
M1	22.05 ± 0.43	27.72 ± 0.83
M2	23.98 ± 0.48	30.63 ± 0.76
Matrin	20.49 ± 0.47	34.16 ± 0.78
Oksimatrin	22.76 ± 0.68	23.68 ± 0.40
Donepezil	78.62 ± 1.06	96.85 ± 1.07
Takrin	97.30 ± 1.23	98.07 ± 1.18
Galantamin	62.37 ± 1.02	83.47 ± 1.08

Tablo 4. Numunelerin (mg/mL) ve antimikrobiyallerin (µg/mL)mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen antimikrobiyal aktivite sonuçları (Saf maddelerin MİK aralığı: 1-0.08 mg/mL Ekstrelerin MİK aralığı: 10-0.8 mg/mL Antimikrobiyallerin MİK aralığı: 16-0.025 µg/mL)

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>H. pylori</i>	<i>C. albicans</i>
Matrin	>1	>1	>1	>1	>1	>1
Oksimatrin	>1	>1	>1	>1	>1	>1
M1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
M2	>1	>1	>1	>1	>1	>1
Amoksisilin	0.5	≤0.125	4	>16	≤0.125	
Klaritromisin	0.5	0.25	≤0.125	>16	0.025	
Tetrasiklin	16	0.25	>16	>16	0.025	
Ketokonazol						0.25
Nistatin						1.25

Ön tarama deneyleri sonucunda *M. rammanianus* ve *E. faecalis* mikroorganizmalarının diğerlerine oranla daha verimli dönüşümlerle M1 ve M2 metabolitlerini ürettiği belirlenmiştir. *M. rammanianus* ile matrinin preparatif biyotransformasyonu gerçekleştirilmiş, oluşan M1 metaboliti süzme işlemi ile kirliliklerinden arındırılmıştır. Ayrıca daha sonraki aşamada *in vitro* olarak matrin, oksimatrin ve metabolitlerinin antimikrobiyal (antibakteriyel, antikandidal, antihelikobakter), antiinflamatuvar (5-LOX inhibisyonu) ve kolinesteraz inhibisyonu biyoaktivite testleri gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında matrin ile ilgili herhangi bir biyotransformasyon verisine rastlanmazken, oksimatrinin yapılan bir tez çalışmasında bu çalışmada da gerçekleştirilen oksimatrin-matrin dönüşümünün olduğu görülmüştür.²³

Mikrodilüsyon yöntemi ile matrin, oksimatrin ve metabolitlerinin belirli mikroorganizmalar için antikandidal ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir. 5-LOX enzimi inhibisyon deneyinde ise standart madde olan NDGA ile karşılaştırıldığında matrin ve oksimatrinin orta düzeyde bir 5-LOX enzim inhibisyonu yaptığı görülmüştür.

Ellman metodu ile gerçekleştirilen kolinesteraz inhibisyonu deneylerinde substrat matrin ve oksimatrinin biyotransformasyon sonucu oluşan metabolitleri ile butirilkolinesteraz ve asetilkolinesteraz inhibisyonları kıyaslamalı olarak incelenmiştir. Bu deneyler sonucunda substratlar ile metabolitlerin kolinesteraz inhibisyonları arasında ciddi bir fark olmadığı, ancak metabolitlerin substratlara göre çok az daha yüksek inhibisyona yol açtığı görülmüştür.

Kaynak taramaları sonucu matrin metabolitlerinin herhangi bir biyotransformasyon sonucunda elde edilmediği görülmüştür. Matrinin ise oksimatrinin yaygın bir metaboliti olduğu ortaya konulmuştur.¹⁷

Sonuç olarak tanımlanan metabolitler, bu çalışmada belirlenen

mikroorganizmalar yardımıyla matrin ve oksimatrinin hareketle elde edilerek biyoaktiviteleri açısından değerlendirilebilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda substratların ve metabolitlerin biyolojik olarak umulan *in vitro* biyolojik aktivite seviyesinde olmadığı söylenebilmektedir.

Yazar Katkıları: Arş. Gör. Ayşe Esra Karadağ ve Prof. Dr. Fatih Demirci biyotransformasyon, antimikrobiyal aktivite, asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu ve 5-lipooksijenaz (LOX) enzim deneylerini birlikte gerçekleştirmiştir.

Çıkar Çatışması: Yoktur.

Mali Destek: Bu çalışma Anadolu Üniversitesi BAP komisyonu tarafından 1601S029 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Dutta NN, Hammar F, Haralampidis D, Karanth NG. History of Modern Genetics in Germany. In: Krishna S, Hari E, History and Trends in Bioprocessing and Biotechnology, 1st Ed., Berlin Heidelberg: Springer, 2001:5-25.
2. Zhou Y, Wu Y, Deng L, Chen L. The alkaloids matrine of the root of *Sophora flavescens* prevents arrhythmogenic effect of ouabain. *Phytomedicine* 2014;21(7):931-935.
3. Kinghorn AD, Balandrin MF, Pelletier SW. Alkaloids. *Chemical and Biological Perspectives* 1984;2:105.
4. Ma LD, Wen SH, Zhan Y, He YJ, Liu XS, Jiang JK. Anticancer effects of the Chinese medicine matrin on murine hepatocellular carcinoma cells. *Planta Medica* 2008;74:245-251.
5. Zhang G, Jiang L, Zhang L. Anti-tumor effect of matrine combined with cisplatin on rat models of cervical cancer. *Asian Pac J Trop Med* 2015;8:1055-1059.
6. Ding T. The preparing and clinical applications of complex matrin Liniment.

- ACTA Chinese Medicine and Pharmacology* 2002;30(2):4748.
7. Chen JX, Shen HH, Niu M, Guo YM, Liu XQ, Han YZ, Zhang Y, Zhao Y, Bau B, Zhou W, Xiao XH. Anti-hepatitis B virus effect of matrine-type alkaloid and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and tumor necrosis factor receptor-associated factor 6. *Virus Res* 2016;215:104-113.
 8. Zhang YB, Luo D, Yang L, Cheng W, He LJ, Kuang GK, Wang GC. Matrine-Type Alkaloids from the Roots of *Sophora flavescens* and Their Antiviral Activities against the Hepatitis B Virus. *J Nat Prod* 2018;81(10):2259-2265.
 9. Zhang YB, Zhang XL, Chen NH, Wu ZN, Ye WC, Li YL, Wang GC. Four matrine-based alkaloids with antiviral activities against HBV from the seeds of *Sophora alopecuroides*. *Org Lett* 2017;19(2):424-427.
 10. Liang N, Nikolova D, Jakobsen JC, Gluud C, Liu JP. Radix *Sophorae flavescens* versus antiviral drugs for chronic hepatitis B. *Cochrane Database Syst Rev* 2018;(8):111-115.
 11. Higashiyama K, Takeuchi Y, Yamauchi T, Imai S, Kamei J, Yajima Y, Narita M, Suzuki T. Implication of the descending dynorphinergic neuron projecting to the spinal cord in the (+)-matrin and (+)-allomatrin induced antinociceptive effects. *Biol Pharm Bull* 2005;28:845-848.
 12. Zhou J, Mei Y, Yi L. Research progress on pharmacology of the alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. *J Pediatr Pharmacol* 2008;14:61-64.
 13. Zhu NX, Luo WJ, Yu RX, Lv QH, Xu RZ, Zhen S. Study on inducing and differentiating function and mechanism of matrine on leukaemia cells. *ACTA Traditional Chinese Medicine Pharmacology* 2001;15:43-44.
 14. Zhang G, Jiang L, Zhang L. Anti-tumor effect of matrine combined with cisplatin on rat models of cervical cancer. *Asian Pac J Trop Med* 2015;8:1055-1059.
 15. Krishna PM, Knv R, Sandhya S, Banji D. A review on phytochemical, ethnomedical and pharmacological studies on genus *Sophora*, Fabaceae. *Braz J Pharmacog* 2012;22(5):1145-1154.
 16. Jiang Y, Zhu Y, Mu Q, Luo H, Zhi Y, Shen X. Oxymatrine provides protection against Coxsackievirus B3-induced myocarditis in BALB/c mice. *Antiviral Res* 2017;141:133-139.
 17. Long Y, Lin X.T, Zeng KL, Zhang L. Efficacy of intramuscular matrine in the treatment of chronic Hepatitis B. *Hepatob Pancreat Dis* 2004;3:69-72.
 18. Zhou YJ, Guo YJ, Yang XL, Ou ZL. Anti-cervical cancer role of matrine, oxymatrine and *Sophora flavescens* alkaloid gels and its mechanism. *J Cancer* 2018;9(8):1357.
 19. Jung Y, Shanmugam M, Narula A, Kim C, Lee J, Namjoshi O, Ahn K. Oxymatrine Attenuates Tumor Growth and Deactivates STAT5 Signaling in a Lung Cancer Xenograft Model. *Cancers* 2019;11(1):49.
 20. Zhang G, Jiang L, Zhang L. Anti-tumor effect of matrine combined with cisplatin on rat models of cervical cancer. *Asian Pacific J Trop Med* 2015;8:1055-1059.
 21. Shi Y, Shen G, Fang H, Xu C, Hu S. Method for quantitative determination of matrine in *Sophora alopecuroides* L. and its inhibitory effect on breast cancer MCF-7 cell proliferation. *Biomed Res* 2015;26(3):461-466.
 22. Li Z, Zheng L, Shi J, Zhang G. Toxic Markers of Matrine Determined Using ¹H-NMR-Based Metabolomics in Cultured Cells *in vitro* and rats *in vivo*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015;11:97-99.
 23. Iverson CD. Identification of Glutathione S-Transferase Inhibiting Natural Products From *Matricaria chamomilla* and Biotransformation Studies on Oxymatrine and Harmine. (PhD Thesis). Faculty of Graduate Studies of The University of Manitoba, Canada, 2010.
 24. Baylac S, & Racine P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *International Journal of Aromatherapy* 2003;13(2-3):138-142.

25. Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology* 1961;7(2):88-95.
26. Mathers AJ. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. Amsterdam D, In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th Ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1996:52-111.
27. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Broth Dilution Procedures. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, CLSI M7-A7, 8th Ed., 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA 2006:123-129.