



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

***EISENIA FOETIDA (SAVIGNY) ADLI SOLUCAN
TÜRÜNE AİT EKSTRELERİN ENZİM İNHİBİTÖR
ETKİLERİ YÖNÜNDEN İNCELENMESİ***

ŞİRİN MELİS ASLAN

FARMAKOĞNOZİ ANABİLİM DALI

OCAK 2022



***EISENIA FOETIDA* (SAVIGNY) ADLI SOLUCAN TÜRÜNE AIT
EKSTRELERİN ENZİM İNHİBİTÖR ETKİLERİ YÖNÜNDEN
İNCELENMESİ**

Şirin Melis ASLAN

**DOKTORA TEZİ
FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Şirin Melis ASLAN

24/01/2022

EISENIA FOETIDA (SAVIGNY) ADLI SOLUCAN TÜRÜNE AİT EKSTRELERİN
ENZİM İNHİBİTÖR ETKİLERİ YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Şirin Melis ASLAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2022

ÖZET

Bu tez çalışmasında, “kırmızı Kalifornia solucanı” olarak da bilinen ve vermikompost olarak yaygın şekilde kullanılan *Eisenia foetida* (Savigny) adlı solucan türü Farmakognozik açıdan incelenmiştir. Bu amaçla solucanın kendisinden ve sıvı ile katı gübrelerinden hareketle diklorometan (DKM), etil asetat (EtOAc) ve etanol (EtOH) ekstraheleri hazırlanmış ve nöroprotektif etkiye yönelik asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesterazdan (BChE) oluşan kolinesteraz enzim ailesi ile cilt beyazlatıcı etkiye yönelik tirozinaz (TYR), antioksidan etkiye yönelik ksantin oksidaz (KO) ve kırışıklık karşıtı etkisi ile ilgili olarak kolajenaz ve elastaz enzimlerine yönelik *in vitro* inhibitör aktiviteleri yönünden ELISA mikroplak yöntemiyle test edilmiştir. Solucanın rejenerasyon yeteneği göz önüne alınarak; solucan EtOH ekstresinin nöral krest kökenli dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin (DP-MKH) kemikleşme ve farklılaşmasındaki rolü ile ekstraselüler matriks komponentlerine etkisi araştırılmıştır. BChE ve kolajenaz inhibitör etkilerine bağlı olarak, solucanın katı gübresinden elde edilen EtOH ekstresi ile solucan DKM ekstresi, silika jel kolon kromatografisine uygulanarak fraksiyonlanmış ve fraksiyonların da bahsi geçen enzimlere karşı inhibitör etkileri tayin edilmiştir. Solucan EtOH ekstresi üzerinde sıvı kromatografisi-dört kutuplu-uçuş zamanlı-kütle spektrometresi (liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry, LC-Q-ToF-MS) ile analiz yapılarak ve literatür verileri ile karşılaştırılarak kimyasal içeriği aydınlatılmaya çalışılmıştır. Katı gübre EtOH ve solucan EtOH ekstresinde çoğu aminoasit ve türevleri ile peptit yapısında olan 20 adet bileşik teşhis edilmiştir. Bu bileşiklerin yanısıra ektoin ve hipoksantin üzerinde de moleküler kenetlenme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak tez çalışmamız, ülkemizde *E. foetida* ve gübreleri üzerinde bahsi geçen etkileri yönünden yapılan ilk Farmakognozik çalışmayı teşkil etmektedir. Tez çalışmaları esnasında, Türk Patent Kurumuna “Kırmızı Kaliforniya Solucan Ekstresi ve Kullanımı” adlı patent başvurusu yapılmış olup, ürün geliştirme yönünde çalışmalarımız devam edecektir.

Bilim Kodu : 1017
Anahtar Kelimeler : *Eisenia foetida*, Kırmızı Kaliforniya Solucanı, Enzim İnhibisyonu, Hücre Kültürü, LC-Q-ToF-MS, Etnozooloji
Sayfa Adedi : 96
Danışman : Prof. Dr. İlkay ERDOĞAN ORHAN

INVESTIGATION OF THE EXTRACTS BELONGING TO THE WORM SPECIES
EISENIA FOETIDA (SAVIGNY) FOR THEIR ENZYME INHIBITORY ACTIVITY

(Ph.D. Thesis)

Şirin Melis ASLAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2022

ABSTRACT

In this thesis, the worm species *Eisenia foetida* (Savigny), also known as the "red California worm" and widely used as vermicompost, was investigated in terms of Pharmacognosy. For this purpose, dichloromethane (DKM), ethyl acetate (EtOAc) and ethanol (EtOH) extracts were prepared based on the earthworm itself and its liquid and solid fertilizers. The extracts were tested using ELISA microplate assays for their in vitro inhibitory activities against cholinesterase enzyme family consisting of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) for neuroprotective effect, tyrosinase (TYR) for skin whitening effect, xanthine oxidase (KO) for antioxidant effect as well as collagenase and elastase enzymes for anti-wrinkle effect. Considering the regeneration ability of the worm, the role of worm EtOH extract in the ossification and differentiation of neural crest-derived dental pulp mesenchymal stem cells (DP-MSC) and its effects on extracellular matrix components were investigated. Due to BChE and collagenase inhibitory effects, the EtOH extract obtained from solid manure of earthworm and DKM extract of the earthworm were fractionated by applying silica gel column chromatography. The inhibitory effects of the fractions against the mentioned enzymes were also determined. The chemical content of the worm EtOH extract was tried to be clarified by analyzing with liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (LC-Q-ToF-MS) and comparing with the literature data. In solid manure EtOH and earthworm EtOH extracts, 20 compounds, most of which are amino acids and derivatives, and peptide, were identified. In addition to these compounds, molecular docking experiments were also carried out on ectoine and hypoxanthine. As a result, our thesis is the first pharmacognosic study in our country in terms of its effects on *E. foetida* and its fertilizers. During the thesis studies, a patent application called "Red California Worm Extract and Its Use" was made to the Turkish Patent Institute and we will continue to work on the product development.

Science Code : 1017

Key Words : *Eisenia foetida*, Red Californian Worm, Enzyme Inhibition, Cell Culture, LC-Q-ToF-MS, Ethnozoology

Page Number : 96

Supervisor : Prof. Dr. İlkey ERDOĞAN ORHAN

TEŞEKKÜR

Tez konum için beni yönlendiren, doktora eğitimim ve çalışmalarım sırasında bana her konuda destek verip cesaretlendiren, danışmanım olduğu için kendimi çok şanslı hissettiğim, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve her zaman örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. İlkay ERDOĞAN ORHAN'a tüm emekleri ve hoşgörüsü için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmama değerli yorum ve önerileri ile katkıda bulunan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, laboratuvarını bana açan, birlikte deneyler yaptığımız Gazi Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül MENDİ hocama çok teşekkür ederim. Doktora tez çalışmamıza konu olan *E. foetida* cinsi solucan türü ve gübresi materyallerinin teminini sağlayan Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Peyzaj Mimarlığı Bölümü, Bitki Materyali ve Yetiştiriciliği Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Turan YÜKSEK'e ve fitokimyasal analizlerde yardımcı olan Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi'nden Dr. Öğr. Gör. İ. Ayhan AYSAL'a çok teşekkür ederim.

Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyeleri ile araştırma görevlisi arkadaşlarıma desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

“Yurt İçi Doktora Burs Programı” (2211) ile sağladığı maddi imkân için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamızın deneysel kısmında kullanılan madde ve malzemelerin temininin Prof. Dr. İlkay ERDOĞAN ORHAN'ın Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA) tarafından sağlanan araştırma bütçesinden karşılanması nedeniyle maddi destekleri için TÜBA'ya şükranlarımızı sunarız.

Tüm bunların ötesinde bugünlere gelmemde maddi ve manevi her türlü emeği esirgemeyen canım ailem; babam Erhan ASLAN, kardeşlerim Fatma Ayça YILDIZ ve Mert ASLAN, ailemize yeni katılan ve bize neşe katan yeğenim Sevilay YILDIZ ve görebilse çok gururlanacağına emin olduğum rahmetli annem Selver ASLAN'a, bana gösterdikleri karşılıksız sevgi, kattıkları her şey ve emeklerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Eisenia foetida</i> (Savigny, 1826) Taksonomisi ve Anatomisi.....	3
2.2. <i>Eisenia foetida</i> 'nın Kullanım Alanları	6
2.2.1. Solucanların etnozoolojik kullanımı	7
2.3. <i>Eisenia foetida</i> 'da Bulunan Metabolitler	10
2.4. <i>Eisenia foetida</i> Üzerinde Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. Gereç	33
3.2. Yöntemler.....	34
3.2.1. Ekstrelerin hazırlanması.....	34
3.2.2. Enzim inhibisyon testleri.....	35
3.2.3. Hücre kültürü deneyleri.....	39
3.2.4. Kimyasal analizler.....	40
3.2.5. Moleküler kenetlenme çalışmaları	46
4. BULGULAR	47

	Sayfa
4.1. Ekstrelerin Verimine Ait Bulgular	47
4.2. Ekstrelerin ve Fraksiyonların Enzim İnhibisyonlarına Dair Bulgular	47
4.3. Moleküler Kenetlenme Bulguları.....	50
4.4. DP-MKHHücre Kültürü Deneyine Ait Bulgular	52
4.5. <i>E. foetida</i> Solucan EtOH Ekstresinde Yapılan LC-Q-ToF-MS Analizlerine Ait Bulgular.....	57
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR	77
EKLER.....	93
EK-1. “Kırmızı Kaliforniya Solucan Ekstresi ve Kullanımı” adlı patent başvurusu (26.12.2019).....	94
EK-2. Ankara Kalkınma Ajansı tarafından yurt çapında düzenlenen proje yarışmasında ilk 100 proje arasına giren, “Kırmızı Kaliforniya Solucanı – Kozmetik Ürün ve Diş Sağlığında Yeni Bir Doğal Hammadde” başlıklı projemizin afişi.....	95
ÖZGEÇMİŞ	96

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. LC-Q-ToF-MS analizinde uygulanan kromatografik şartlar.....	45
Çizelge 3.2. LC-MS-MS analizinde kullanılan gradient solvan sistemi.....	45
Çizelge 4.1. <i>E. foetida</i> ekstrelerine ait % verimler	47
Çizelge 4.2. <i>E. foetida</i> katı gübre EtOH ekstresinin enzim inhibitör etkisi.....	48
Çizelge 4.3. <i>E. foetida</i> solucan ve katı gübre ekstrelerinin kolajenaz, KO, elastaz, AChE, BChE ve TYR inhibitör etkisi	48
Çizelge 4.4. Katı gübre EtOH ekstresine ait fraksiyonların BChE inhibitör etkileri.....	49
Çizelge 4.5. Solucan DKM ekstresine ait fraksiyonların BChE inhibitör etkileri.....	49
Çizelge 4.6. Katı gübre EtOH ekstresine ait fraksiyonların kolajenaz inhibitör etkileri	50
Çizelge 4.7. Solucan EtOH ekstresi LC Q-ToF-MS analizi ile bulunan bileşikler	58

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. G90 ekstresinin malign tümörün lokalize olduğu dokulara göre fibrinolizis süresinin değişimi	23
Şekil 3.1. Ellman yönteminin reaksiyon mekanizması	35
Şekil 4.1. İnsan BChE enzim aktif bölgesinde (PDB kodu: 4TPK) ektoin (A), hipoksantin (B) için belirlenen bağlantı modları ve elde edilen etkileşimlerin 2B şematik gösterimi. (Hidrojen bağları sarı, π - π etkileşimleri turkuaz, π -katyon etkileşimleri mor, tuz köprü	51
Şekil 4.2. Liyofilize sıvı gübre ve solucan EtOH ekstresi ile 24 saat muamele edilen DP-MKH hücrelerinde canlılık sonuçları	52
Şekil 4.3. Liyofilize sıvı gübre ve solucan EtOH ekstresi ile 48 saat muamele edilen DP-MKH hücrelerinde canlılık sonuçları	53
Şekil 4.4. Liyofilize sıvı gübre ve solucan ve EtOH ekstresi ile 24 ve 48 saat muamele edilen DP-MKH hücrelerinde canlılık sonuçları	53
Şekil 4.5. <i>E. foetida</i> EtOH ekstresi ile 24 ve 48 saat muamele edilen DP-MKH hücrelerinde canlılık sonuçları	54
Şekil 4.6. <i>E. foetida</i> solucan EtOH ekstresinin DP-MKH hücrelerinde kemikleşmesinde kalsiyum konsantrasyonuna olan etkisi	55
Şekil 4.7. <i>E. foetida</i> solucan EtOH ekstresi ile kemikleşmeye yönlendirilen DP-MKH hücrelerinde kalsiyum konsantrasyon miktarları	56
Şekil 4.8. <i>E. foetida</i> solucan EtOH ekstresi ile kemikleşmeye yönlendirilen DP-MKH hücrelerinde osteonektin miktarları	56
Şekil 4.9. <i>E. foetida</i> solucan EtOH ekstresi ile kemikleşmeye yönlendirilen DP-MKH hücrelerinde osteokalsin miktarları	57
Şekil 4.10. <i>E. foetida</i> 'nın solucan EtOH ekstresinin DP-MKH ekstraselüler matriksinde yer alan kolajen miktarına olan etkisi	57
Şekil 4.11. Solucan EtOH ekstresine ait TIC	59
Şekil 4.12. Histidine ait TIC ve KS	59
Şekil 4.13. Lizine ait TIC ve KS	59
Şekil 4.14. <i>Nϵ,Nϵ,Nϵ</i> -Trimetillizine ait TIC ve KS	60
Şekil 4.15. <i>N,N</i> -Dimetilhistidine ait TIC ve KS	60

Şekil	Sayfa
Şekil 4.16. Koline ait TIC ve KS	60
Şekil 4.17. Valine ait TIC ve KS	61
Şekil 4.18. Ektoine ait TIC ve KS.....	61
Şekil 4.19. Metionine ait TIC ve KS.....	61
Şekil 4.20. Hipoksantine ait TIC ve KS.....	62
Şekil 4.21. 3-Amino-3-(4-hidroksifenil)propanoata ait TIC ve KS.....	62
Şekil 4.22. Lösin (üstteki)/izolösine (alttaki) ait TIC ve KS	63
Şekil 4.23. Tirozine ait TIC ve KS	63
Şekil 4.24. N-Hidroksil-triptamine ait TIC ve KS	64
Şekil 4.25. Fenilalanine ait TIC ve KS	64
Şekil 4.26. 1-Naftilamine ait TIC ve KS.....	64
Şekil 4.27. Triptofana ait TIC ve KS	65
Şekil 4.28. OEP-3121'e ait TIC ve KS.....	65
Şekil 4.29. VQ-5'e ait TIC ve KS.....	65
Şekil 4.30. SP-8203'e ait TIC ve KS	66
Şekil 4.31. EF-EtOH-7 kodlu fraksiyona ait TIC	66
Şekil 4.32. EF-EtOH-7 kodlu fraksiyonda tespit edilen lösin/izolösine ait KS.....	66
Şekil 5.1. <i>E. foetida</i> ekstreleri üzerinde tez kapsamında yaptığımız çalışmalar.....	69
Şekil 5.2. Ektoin (solda) ve hipoksantin (sağda)	70

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>Eisenia foetida</i>	3
Resim 2.2. <i>E. foetida</i> vücut anatomisi	4
Resim 2.3. Solucanların yaşam döngüsü	5
Resim 2.4. <i>E. foetida</i> kozaları.....	5
Resim 2.5. <i>Andiorrhinus kuru</i> ve <i>A. motto</i> 'dan yemek hazırlanması	9
Resim 2.6. <i>Pheretima aspergillum</i> adlı solucandan elde edilen drog ve preparatı.....	9
Resim 2.7. <i>E. foetida</i> 'nın SEM ile çekilen anatomik yapısıa) Sindirim borusu, gövde ve tüyler b) Sindirim borusu, solömik boşluk ve sekresyon vezikülleri	14
Resim 3.1. Katı ve sıvı solucan gübresi üretiminde kullanılan besleme düzeneği.....	33
Resim 3.2. Tezekten elde edilen katı solucan gübresi elde edilme aşamaları	34
Resim 3.3. <i>E. foetida</i> katı gübre EtOH ekstresine ait KK.....	41
Resim 3.4. <i>E. foetida</i> solucan DKM ekstresine ait KK	42
Resim 3.5. <i>E. foetida</i> 'dan hazırlanan ekstrelerin İTK profili	42
Resim 3.6. UV 254 nm'de (solda) ve 366 nm'de (sağda) ekstrelerin İTK profili.....	43
Resim 3.7. UV 254 nm'de (solda) ve 366 nm'de (sağda) ekstrelerin İTK profili.....	43
Resim 3.8. <i>E. foetida</i> katı gübresi EtOH ekstresine ait alt fraksiyonlarının 254 nm (solda) ve 366 nm'de (sağda) İTK profili.....	44
Resim 3.9. <i>E. foetida</i> katı gübre EtOH ekstresinin KK fraksiyonlarının İTK profili	44
Resim 3.10. <i>E. foetida</i> DKM ekstresine ait alt fraksiyonların 254 nm (solda) ve 366 nm'de (sağda) İTK profili.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Santigrad derece
a/a	Ağırlık/ağırlık
amu	Atomic mass unit
cm	Santimetre
cfu	Colony-forming unit
dk	Dakika
g	Gram
h/h	Hacim/hacim
kg	Kilogram
L	Litre
m	Metre
M	Molar
mm	Milimetre
mg	Miligram
mL	Mililitre
m/z	Kütle/yük
ppm	Parts <i>per</i> million
Psi	Pounds <i>per</i> square inch
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
uku	Urokinase unit

Kısaltmalar	Açıklamalar
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABP	Antijen-bağlayan protein
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-etilbenztiyazolin-6-sülfonikası)
AChE	Asetilkolinesteraz
BChE	Bütirilkolinesteraz
BH	Bolton Hunter
CCF-1	Coelomic cytolytic factor-1
cDNA	Complementary DNA
CMF	Coelomic mytogenic factor
CMV	Cucumber mosaic virüs
COX	Cyclooxygenase
DEAE	Dietilaminoetil
DKM	Diklorometan
DMEM-LG	Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose
DMSO	Dimetilsülfoksit
DP-MKH	Dental pulpa mezenkimal kök hücreleri
EEP	Earthworm excitatory peptides
EFAF	<i>Eisenia foetida</i> Andrei faktörü
EF-SP1	<i>Eisenia foetida</i> serin proteaz 1
EF Ea	Earthworm fibrinolytic enzyme A
EF-3	Earthworm fibrinolytic enzyme-3
EGCG	Epigallokateşin gallat
ELISA	Enzyme-linked immunoassay
Erk1/2	Extracellular signal-regulated kinase
ESM	Ekstraselüler matriks
EtOAc	Etil asetat
EtOH	Etanol
ETP	<i>Eisenia foetida</i> tetradekapeptiti
FAB-MS:	Fast atom bombardment-mass spectrometry
FALGPA:	N-(3-[2-furil]akriloil)-Leu-Gly-Pro-Ala

Kısaltmalar	Açıklamalar
FBS:	Fetal bovine serum
FDA:	Food and Drug Administration
GLP-1:	Glucagon-like peptide-1
HPLC	High performance liquid chromatography
IC	Inhibitory concentration
Ig	İmmüoglobulin
IKKα/β	I kappa B kinase α/β
İTK	İnce tabaka kromatografisi
JNK	c-Jun <i>N</i> -terminal kinase
kDa	Kilodalton
KK	Kolon kromatografisi
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LC-Q-ToF-MS	Liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry
L-DOPA	Levodopa/3,4-dihidroksi-L-fenilalanin
LPS	Lipopolisakkarit
MALDI-ToF	Matriks-assisted lazer desorption ionization time of flight
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MATP	Myoactive tetradecapeptide
MIR	Multiple isomorphous replacement
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
MKH	Mezenkimal kök hücre
MMP	Matriks metalloproteinaz
M.Ö.	Milattan önce
M.S.	Milattan sonra
MS	Kütle spektroskopisi
MSACK	<i>N</i> -(methoxysuccinyl)-Ala-Ala-Pro-Val-chloromethyl ketone
NDI	New dietary ingredient
NNGH	<i>N</i> -isobutyl- <i>N</i> -(4-methoxyphenylsulfonyl)-glycylhydroxamic acid
OASIS	Oriental Medicine Advanced Searching Integrated System
OCN	Osteokalsin
ON	Osteonektin

Kısaltmalar	Açıklamalar
OPLS4	Optimized potential for liquid simulations
PAF	Platelet-aktive edici faktör
PAS	Peripheral anionic site
PBS	Phosphate buffer solution
PDB	Protein data bank
PECAM-1	Platelet endothel cell adhesion molecule-1
RMSD	Root-mean-square deviation
RT-PCR	Real time polimerase chain reaction
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Scanning electron microscope
SP	Serin proteaz
S.S.	Standart sapma
TIC	Total ion chromatogram
TMV	Tomato mosaic virüs
TNF	Tumor-necrosis factor
TYR	Tirozinaz
v.a.	Vücut ağırlığı
XP	Extra Precision

1. GİRİŞ

Farmakognozi, Eczacılık biliminin temel disiplinlerinden biri olup, “doğal/biyolojik kökenli ilaç hammaddeleri, etken maddeleri ile yardımcı maddelerin izolasyonunu, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini, saklanma koşullarını vs. inceleyen bilim dalı” olarak tanımlanmaktadır. Kelime kökenine bakıldığında; Farmakognozi ilaç anlamındaki “*farmakon*” ile bilgi anlamına gelen “*gnosis*” kelimelerinin birleşmesinden türediği için “ilaç bilgisi” anlamına gelmektedir. "Farmakognozi" terimi ilk kez 1811'de Avusturyalı hekim Schmidt ve 1815'te Anotheus Seydler tarafından yazılan “*Analecta Pharmacognostica*” adlı eserlerde kullanılmıştır (Erdoğan Orhan, 2014). Farmakognozi’de ilaç adayı moleküllerin araştırılmasında doğal/biyolojik kaynakları kullandığı için, bu kaynaklar bitkilerin yanısıra hayvansal türler ile deniz canlıları, mineraller ve mikroorganizmaları da kapsamaktadır. Geçmişten bugüne Farmakognozi araştırmalarında en yaygın kullanılan doğal kaynak bitkiler olmasına rağmen, bu açıdan daha az incelenen kaynaklar olarak hayvanlar (özellikle böcekler ve hayvansal venomlar) ve deniz canlıları üzerindeki çalışmalar da son yıllarda ivme kazanmıştır. Hatta hayvansal türlerin kullanıldığı araştırmalar “zoofarmakognozi/zooterapi” olarak adlandırılmaktadır (Costa-Neto, 2005). Hayvansal-temelli tıbbi ürünlerin yıllık ticaretinin milyarlarca dolar olduğu bildirilmiştir (Kunin ve Lawton, 1996). Marquez (1997) tarafından yapılan bir araştırmaya göre; 252 elzem kimyasalın %11,1’i bitkilerden, %8,7’si hayvanlardan elde edilmiştir. Ayrıca Dünya Kaynak Enstitüsü’nün (World Resource Institute, WRI) 2000 yılındaki raporuna göre; Amerika Birleşik Devletleri’nde (ABD) kullanılan 150 reçeteli ilaçtan 27 tanesi hayvansal kökenlidir (WRI, 2000). Bunlardan en bilinenleri; *Bothrops jararaca* adlı yılan türünün venomundan hareketle geliştirilen ve anjiyotensin-dönüştürücü enzim (angiotensin-converting enzyme, ACE) olarak hipertansiyon tedavisinde kullanılan kaptopril adlı ilaç etken maddesi ile *Heloderma suspectum* adlı sürüngen türünün venomundan elde edilen glukogan-benzeri peptit 1’den hareketle geliştirilen antidiyabetik etkili ekzendin-4 adlı moleküldür (Bisset, 1991; Furman, 2012).

Hayvanlar âlemi (Animalia) içinde yer alan Annelida takımındaki en geniş gruplardan biri olan solucanların şu anda 1 milyon civarında türü kapsadığı tahmin edilmektedir. Özellikle Uzakdoğu ülkelerinde gıda olarak kullanılan türlerin yanısıra, geleneksel Çin tıbbında solucan türlerinin kullanımının 4000 yıllık bir tarihe sahip olduğu kayıtlıdır (Zhang vd., 1992; Cooper vd., 2012). Solucan türleri içinde, halkalı solucanları içeren Lumbricidae

familyasından olan *Eisenia foetida* (Savigny), ilk defa California Enstitüsü'nde (ABD) kültüre alınmasından dolayı "kırmızı Kaliforniya solucanı" (red Californian worm) olarak bilinmekte olup, ülkemizde ve dünyada yaygın bir şekilde vermikompost (solucan gübresi) hazırlamak için üretilmektedir. Bu amaçla pek çok üretim çiftliği kurulmuş olup, çift cinsiyetli (hermafrodit) bir tür olan *E. foetida* en önemli ekolojik denge unsurlarından biri olarak kabul edilmektedir (Gunadi ve Edwards, 2003). Çeşitli atıklardan oluşan bir çeşit mama ile beslenen ve bağırsaklarında işleyebilen bu solucan türünün dışkısı ile elde edilen vermikompost, bitki yetiştirilmesinde yüksek verim alınmasını sağlayan doğal bir gübredir (Yüksek, 2019). Vücut ağırlığının yaklaşık yarısı kadar gübre üretebilen *E. foetida* kırmızı renkli bir solucan türü olup, deri ile solunum yapmaktadır ve güneş ışığına dayanıklı değildir. Diğer yandan, *E. foetida*'nın protein, enzim ve diğer makromoleküller açısından çok zengin olduğu gösterilmiştir (Gruber vd., 2000; Kobayashi vd., 2004; Pan vd., 2011; Verma ve Pulicherla, 2016).

Farmakognozi'nin alanının doğal ve biyolojik kaynaklı ilaç hammaddelerinin tümünü kapsamayı itibarıyla, "*Eisenia foetida* (Savigny) Adlı Solucan Türüne Ait Ekstrelerin Enzim İnhibitör Etkileri Yönünden İncelenmesi" adlı doktora tezimizde, *E. foetida* adlı solucan türünün kendisi ile katı gübresinden hareketle elde edilen ekstreler ile liyofilize sıvı gübresinin asetilkolinesteraz (AChE), bütirikolinesteraz (BChE), tirozinaz (TYR), elastaz, kolajenaz ve ksantin oksidaz (KO) enzimlerine karşı inhibitör aktivitesi ELISA mikropalak yöntemi ile incelenmiştir. Ayrıca *E. foetida* adlı solucanın kendini rejenere edebilme özelliği göz önüne alınarak, solucan etanol (EtOH) ekstresinin nöral krest kökenli dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin (DP-MKH) kemikleşme ve farklılaşmasındaki rolü ile ekstraselüler matriks komponentlerine etkisi araştırılmıştır. BChE'a karşı inhibisyon gösteren katı gübre EtOH ekstresi ile solucan diklorometan ekstresi, silika jel kolon kromatografisi ile fraksiyonlanmış ve fraksiyonlara da BChE inhibisyon testi uygulanmıştır. Solucan EtOH ekstresi ile katı gübre EtOH ekstresine ait 7. fraksiyon; sıvı kromatografisi-dört kutuplu-uçuş zamanlı-kütle spektrometresi (liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry, LC-Q-ToF-MS) analizi yapılarak ve literatür verileri ile karşılaştırılarak kimyasal içeriği aydınlatılmaya çalışılmıştır. Çoğu primer metabolit olan 20 adet bileşik teşhis edilmiş; bunlardan ektoin ve hipoksantin BChE'a karşı inhibitör potansiyeli moleküler kenetlenme deneyleri ile incelenmiştir. Sonuç olarak; tez çalışmamız, Anabilim Dalımızda ilk defa bir solucan türü üzerinde yapılan Farmakognozیک bir araştırmayı teşkil etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) Taksonomisi ve Anatomisi



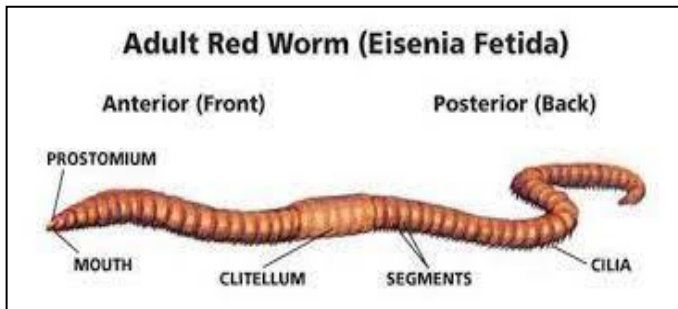
Resim 2.1. *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) (Fotoğraf: Prof. Dr. Turan Yüksek)

Omurgasız hayvanlar grubunda bulunan toprak solucanları Polychaeta, Hirunidea ve Oligochaeta olmak üzere 3 takımdan meydana gelmektedir (Tomlin ve Miller, 1988). Bunların en bilinen örneği; karasal solucanları içeren Oligochaeta sınıfıdır (Kalaç, 1997). Kırmızı Kaliforniya solucanı, toprak solucanlarından halkalı solucan sınıfının Lumbricidae ailesinin 8 türünden biridir. Latince adı *Eisenia foetida* olan bu solucan; ilk kez California Enstitüsünde (ABD) melezlenmesi sebebiyle “kırmızı Kaliforniya solucanı” olarak adlandırılmıştır. *Eisenia foetida* (Savigny, 1826), Lumbricidae familyasına mensup bir solucan türü olup, İngilizce’de “earthworms” olarak bilinen gruba dahildir. “Kompost solucanı” olarak da adlandırılan *E. foetida*’nın uzunluğu 6-8 cm, çapı ise 3-6 mm arasında olup, vücudundaki segment sayısı 80 ile 120 arasındadır (Reinecke ve Viljoen, 1991) (Resim 2.1.). Vücudu turuncu, kırmızı renkte olup; ön (baş) kısmı daha kalın kaslıdır. Baş kısmının uç tarafında ağız, kuyruk kısmındaysa rektumu yer alır. Ön tarafı daha kalın ve koyu turuncu renklidir. Arka kuyruk tarafı ise daha ince ve zayıftır. Ağırlığı genellikle 0,2-1,2 g arasındadır. Solucanın dış dokuları genelde ince kütikula yapısında ve setalıdır. Vücutları iç içe girmiş tüp şeklinde segmentli, yumuşak, iskeletsiz ve renklidir. İki tüp arasında uzanan sinir sistemine, 8 ağızdan anüse uzanan uzun bir sindirim kanalına ve su dengesini sağlayan bir boşaltım sistemine sahiptirler. Tüpler arasındaki boşluk sölom (coelom) sıvısıyla doludur (Tomlin ve Miller, 1988).

E. foetida'nın taksonomik hiyerarşisi şu şekildedir:

Âlem:	Animalia
Şube:	Annelida
Sınıf:	Clitellata
Takım:	Opisthopora
Familya:	Lumbricidae
Cins:	<i>Eisenia</i>
Tür:	<i>E. foetida</i> (Savigny, 1826) (sin. <i>E. fetida</i>)

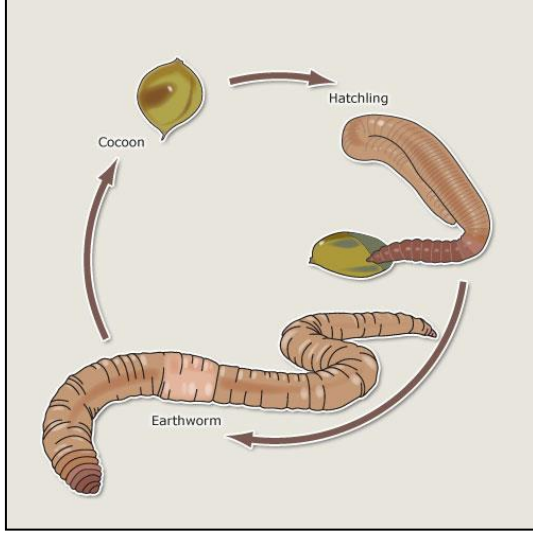
E. foetida'daki sinirler, kaslarda kasılma-gevşeme hareketini ve vücuttaki organlarla iletişimi sağlarlar. Solucanlar, solunumu vücut yüzeyi ile yapar ve solunum pigmenti olarak hemoglobin taşırlar. Solucanlar kesilen vücut parçalarını yenileyebilme (rejenere etme) yeteneğine sahiptir. Bu özellik solucanların hayatta kalma başarılarını arttıran önemli bir özelliktir (Tomlin ve Miller, 1988; Zhu vd., 1996). Kaliforniya solucanları diğer solucanlara kıyasla daha dayanıklıdırlar ve üreme hızları daha yüksektir. Güneş ışığını pek sevmezler. Doğrudan güneş ışığına maruz kaldıklarında ise ölürlür. En fazla 40°C sıcaklığa kadar dayanabilirler. Solucanların kışın yatak sıcaklığının 0°C derecenin altına düşmemesi gerekir. Yetişkin bir bireyin vücut anatomisi; ağız, anüs, klitellum, segment ve silia kısımlarından oluşmaktadır (https://www.uwsp.edu/cnr-ap/leaf/school-forests/Documents/Forest%20Health_Wisconsin%20Worm%20Watch.pdf, son erişim tarihi: 30.07.2021) (Resim2.2.).



Resim 2.2. *E. foetida* vücut anatomisi

Diğer solucanlar gibi, genellikle kısa bir yaşam döngüsüne sahip olan *E. foetida*'nın en önemli özelliklerinden biri üreme hızı olup, bir ay içinde yetişkin solucan 4-5 kova (cocoon) üretir ve her kozada ortalama 6 solucan yumurtası yer alır

(<https://teara.govt.nz/mi/diagram/15491/earthworm-life-cycle>, son erişim tarihi: 30.07.2021) (Resim 2.3.).



Resim 2.3. Solucanların yaşam döngüsü

Kozaları 2,4-5,2 mm boyunda ve 2,3-4,4 mm çapındadır (Sims ve Gerard, 1985; Podolak vd., 2020) (Resim 2.4.).



Resim 2.4. *E. foetida* kozaları (Podolak vd., 2020)

Kaliforniya solucanları çift cinsiyetlidirler (hermafrodit). Çiftleşme, uygun şartlarda sağlandığında gece boyunca ortalama 20-25°C sıcaklıkta gerçekleşir. Çiftleşme sonunda mercimek tanesi büyüklüğünde ve limona benzeyen kozalar oluşur. Kırmızı Kaliforniya solucanları yumurtlayarak çok hızlı çoğalırlar. Bir yılda neredeyse 16-20 katına kadar koza üretebilirler. Bu kozalardaki yumurtalardan yaklaşık 1 ay içinde beyaz renkte ve 2 mm boyunda solucanlar meydana gelmeye başlar. Yumurtadan yeni çıkmış olan solucanlar

yaklaşık 8 hafta içerisinde cinsel olgunluğa ulaşabilmektedir. Ortam sıcaklığı 20-25°C olduğu sürece sürekli üremeye devam ederler. Kaliforniya solucanları ortalama 4-5 yıllık yaşam sürebilirler. Bir günde kendi vücut ağırlıkları kadar besin tüketebilirler ve kendi ağırlıklarının yarısı kadar organik solucan gübresi üretebilirler. Yani vücut ağırlıklarının yaklaşık %55'i kompost (gübre) üretebilme yeteneğine sahiptirler (Edwards ve Bohlen, 1996; Kalaç, 1997; Fadaee, 2012). *E. foetida*'nın üreme oranının, beslendiği besin tipi ile oldukça ilgili olduğu bildirilmiştir (Sangwan vd., 2008). Örneğin, koyun gübresi ile beslenen *E. foetida* solucanlarının biyokütlesinin, at gübresi ile beslenen solucanlara göre çok daha yüksek olduğu saptanmıştır (Kostecka, 2000; Garg vd., 2005). Bu solucanlar yaz sezonu boyunca toprağı kabartıp havalanmasını sağlarlar. Toprakta dağınık halde bulunan organik maddeleri (bitkisel ve hayvansal hücreler, toprak bakterileri, mantarlar vs) yiyerek, toprağı organik madde açısından zenginleştirirler.

Solucan tarafından sindirilen besin ince ve kalın bağırsaklardan geçerek rektumdan çıkar. Sindirilip rektumdan çıkan besin; küçük granüller (korpelitler) şeklindedir. Korpelitler, toprağın yapısını düzenleyen, havalanma ve su tutma özelliklerini iyileştiren, mekanik strese dayanıklılığını artıran ve toprağın yapısını düzenleyerek verimini artıran humik maddeleri (humik asitler ve bunların tuzları) içerirler. Bu nedenle biyolojik gübre olarak kullanımı organik tarımda yaygındır.

2.2. *Eisenia foetida*'nın Kullanım Alanları

E. foetida'dan elde edilen katı ve sıvı formdaki gübre özellikle organik tarımda kullanılmaktadır. Bu solucanlar yaz sezonu boyunca ortalama 1000 m yol kat ederek toprağı kabartıp havalanmasını sağlarlar. Toprakta bulunan organik maddeleri (bitkisel ve hayvansal hücreler, toprak bakterileri, mantarlar vs.) yiyerek toprağı organik madde açısından zenginleştirirler. Solucan beslendiğinde, ağızdan geçen lokma yemek borusu ve gırtlakta birikir ve daha sonra parça parça taşlığa/mideye geçer. Burada sindirilen/öğütülen besin ince ve kalın bağırsaklardan geçerek rektumdan çıkar. Sindirilip rektumdan çıkan besin; küçük granüller (korpelitler) şeklindedir. Korpelitler, toprağın yapısını düzenleyen, havalanma ve su tutma özelliklerini iyileştiren, mekanik strese dayanıklılığını artıran ve toprağın yapısını düzenleyerek verimini artıran humik maddeleri (humik asitler ve bunların tuzları) içerirler. Bu nedenle *E. foetida*'nın biyolojik gübre olarak kullanımı yaygındır. *Eisenia* türlerinin daha çok tercih edilmesinin sebepleri arasında; hızlı besin tüketme

özelliğine sahip olmaları, yeterli besin maddelerine ait ortamlarda yaşamını sürdürebilmeleri, var olan besini tüketmeleri, yüksek üreme gücüne sahip olmaları, farklı çevre koşullarına adapte olabilmeleri ve bütün koşullar sağlandığında popülasyonun büyümesinin fazla olması gösterilebilir (Edwards ve Bohlen, 1996). Diğer yandan, solucanların son zamanlarda kozmetik ürünlerde de kullanıldığı görülmektedir.

2.2.1. Solucanların etnozoolojik kullanımı

Ekolojik olarak önemli canlılar olmalarının yanısıra; solucanlar kadim medeniyetlerden bu yana besin ve şifa kaynağı olarak kullanılmıştır. Özellikle geleneksel Çin tıbbı, Ayurveda ve Kampo tıbbı ile Vietnam ve Kore gibi ülkelerin geleneksel tıp uygulamalarında solucanlara önce besin kaynağı olarak odaklanılmış, daha sonra çeşitli solucan türleri hastalıklara karşı tedavide kullanılmaya başlanmıştır (Cooper vd., 2012). Solucanların tıbbi amaçla en erken kullanımına M.Ö. 1340 yılındaki kayıtlarda rastlanmaktadır (Reynolds ve Reynolds, 1972). Özellikle Burma ve Hindistan'da hekimlerin solucanları tedavide kullanmış oldukları bilinmektedir. Örneğin Burma'da solucanlar ağzı kapalı kaplara konularak ısıtılmış ve külleri yüksek ateş ve hummaya karşı uygulanmıştır. Solucanlar tuz ve soğan ile birlikte suda kaynatılıp, suyu süzülme suretiyle yemeklerine katılarak kadınlarda doğum sonrası halsizliğe karşı, ayrıca solucan külleri tek başına veya bazı bitkilerle karıştırılarak diş tozu olarak da kullanılmıştır. Burma ve Laos'ta solucanlar 20. yüzyıla kadar çiçek hastalığının tedavisinde de solucanların kaynatılması ile süzülen suyun içinde hastaları banyo yaptırmak şeklinde uygulanmıştır (Bristowe, 1932). Ancak insanların yaygın algı olarak solucanları nahoş bulmaları, besin veya ilaç olarak kullanımlarını da sınırlandırmıştır. Geleneksel Çin tıbbındaki *Materia Medica*'da (M.S. 1552), solucanların kurutulup toz edilerek, dekoksasyon halinde veya yakılmak suretiyle elde edilen külleri halinde kullanıldığı kayıtlıdır (Shen, 2010). Özellikle *Pheretima asiatica* (Michaelsen, 1900) ve *Aporrectodea caliginosa trapezoids* (Dugés, 1828) geleneksel tıpta en çok kullanılan solucan türleridir. Bunlardan *A. caliginosa trapezoids* Çin'in güneydoğu kıyılarında yaşarken, *P. asiatica* Çin'in pek çok bölgesinde bulunmaktadır. Solucanlar çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olup, bu solucan için önerilen doz 9-18 g iken, canlı bireyler için 15-30 g arasında bir doz önerilmektedir. Kurutulmuş solucandan elde edilen toz için önerilen doz ise 1,5-3 g arasındadır. Örneğin; boğaz ağrısı için 14 adet solucanın ezilip boğaza uygulanması ve yanısıra solucandan hareketle tuz ve bal konulan dekoksasyonunun içilmesi tavsiye edilmektedir. Ayrıca bazı

bitkilerle karışım halinde de uygulanabilmektedir. Başağrısı için tavada kızartılan solucanlar toz haline getirilir, zencefil özsuğu ile karıştırılır ve bu karışımdan 1,5 g tüketilir. Kızarmış ve şiş gözler için solucandan elde edilen tozun çay ile karıştırılarak içilmesi önerilmektedir. Ayrıca solucanların dışkısı da tıbbi amaçla kullanılabilir. Örneğin dizanteriye karşı, solucanların tavada kızartılmış dışkısının suya eklenip süzülerek içirildiği kayıtlıdır. Kızarık, şişmiş ve ağrılı testislere sahip olan çocuklar için solucanların dışkısının meyan özsuğu ile karıştırılarak, ağrılı ve kızarık bölgeye uygulanması tavsiye edilmiştir.

Diğer yandan, Çin'in Fujian ve Guandong eyaletlerinde günümüzde de besin olarak tüketilen solucanlar, Hainan adasında bambu ile pişirilen çok özel bir yemek olarak kabul edilmektedir (Zheng vd., 1982; Zimian vd., 2005; Ding vd., 2019). Bunun yanı sıra Botswana gibi Afrika ülkelerinde de besin olarak tüketilmektedir (Reynolds ve Reynolds, 1972). İran'da da mesanede oluşan taşları düşürmek için bazı solucan türleri pişmiş olarak ekmele birlikte yenilmektedir. Sarılığa karşı da benzer bir kullanımı kayıtlıdır. Burma'da alopeziye karşı da solucan küllerinin gül yağı içine konularak, saçsız bölgeye uygulandığı bildirilmiştir (Gates, 1926).

Amerika Birleşik Devletleri'nin (ABD) Delaware eyaletinde yaşayan Nanticoke Kızılderilileri solucanları romatizmaya bağlı ağrıları gidermek; Cherokee Kızılderilileri ise kümes hayvanlarına batan dikenleri çıkarmak için kullanmıştır (Carr, 1951). Yapılan bilimsel incelemede, ağrı kesici etkinin solucanların bünyesinde bulunan yağ asitleri ve lipitlerden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.

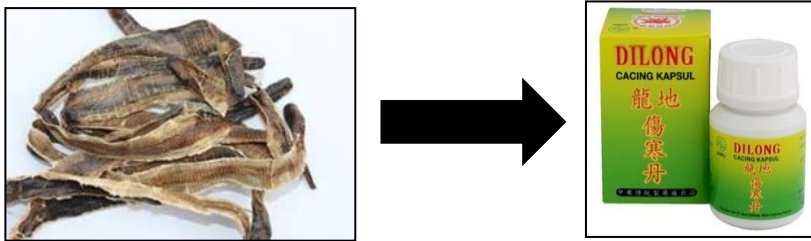
Avustralya ve Yeni Zelanda'da ise halk tarafından "Maori" adı verilen karışımın içinde yerel isimleri ile "Kuharu, Noru, Wharu, Tarao, Pokotea, Tai, Kurekure ve Whiti" olarak bilinen 8 tür solucan yer almakta olup, ölmekte olan kişilerin son yemeği olarak sunulmaktadır (Reynolds ve Reynolds, 1972). Avustralya Aborijinlerinin de solucanları günlük diyetlerinde tükettikleri ve totem olarak benimsedikleri hayvanlardan biri olduğu bildirilmiştir (Spencer ve Gillen, 1904). Papua Yeni Gine'de göçmen kabileler ve Yeni Zelanda'daki Maoriler tarafından protein kaynağı olarak solucanların yenildiği bilinmektedir.

Güney Amerika’da da solucanların kullanımının yaygın olduğu görülmektedir. Örneğin Venezuela’da Alto Orinoco bölgesinde solucan satışının, balık ve diğer hayvan etlerinin 3 katından fazla olduğu kaydedilmiştir (Cooper vd., 2012). Alto Orinoco bölgesinde yaşayan Piaroa Kızılderilileri de yerel dillerinde “gua veya wua” olarak bilinen *Andiorrhinus motto* (Righi ve Araujo Lobo, 1999) adlı solucan türünü besin olarak tüketmektedir. Amazon kabileleri de pek çok solucan türünü besin olarak tüketmektedir (Paoletti ve Dufour, 2005). Ye’kuana kabilesinde, doğumdan sonraki ilk ay içinde kadınlara, *Andiorrhinus kuru* (A.G. Moreno & Paoletti, 2004) ve *A. motto* adlı iri solucan türlerinin suda kaynatılması ve tütsülenmesi suretiyle hazırlanan bir gurme solucan yemeği yedirilmektedir (Paoletti vd., 2003) (Resim 2.5.).



Resim 2.5. *Andiorrhinus kuru* ve *A. motto*’dan yemek hazırlanması (Paoletti vd., 2003)

Diğer yandan, geleneksel Çin tıbbında “dilong” olarak bilinen, *Pheretima aspergillum* E. Perrier [sin. *Amyntas aspergillum* (Perrier, 1872)] adlı solucanın kurutulması ile elde edilen bir hayvansal drog olup, spazmlar, kronik öksürük, yüksek kan basıncı, eklem hastalıkları ve üriner hastalıklara karşı yüzlerce yıldır kullanılmaktadır. Çin’de bu droğu içeren preparatlar da mevcuttur (Cooper vd., 2004 ve 2012)



Resim 2.6. *Pheretima aspergillum* adlı solucandan elde edilen drog ve preparatı (<https://www.tionghoa.info/wp-content/uploads/2017/08/?SD>, son erişim tarihi: 30.07.2021) (Resim 2.6.)

ABD’de Bocom Pharmaceuticals adlı firma, solucan proteini için Amerikan İlaç ve Gıda Dairesine (Food and Drug Administration, FDA) başvurarak, “yeni besin bileşenleri” (new dietary ingredients, NDI) kategorisinde onay almıştır (Ding vd., 2010).

Solucanların halk tıbbında kullanımına bir başka örnek olarak; Afrika’nın batısında bulunan bir ülke olan Benin’de *Eudrilus eugeniae* (Kinberg, 1867) adlı solucan türünün, zor doğumlarda oral olarak tozu, dekoksasyonu veya maseratı şeklinde, epilepsiye karşı oral veya topikal olarak tozu ve dekoksasyonu şeklinde, diyabete karşı dekoksasyon halinde, yüksek ateşe karşı ise tozunun kullanıldığı kaydedilmiştir (Loko vd., 2019). Bunların yanısıra apse, hemoroit, fıtık, cinsel güçsüzlük, mide ağrısı ve baş ağrısı gibi rahatsızlıklara karşı da benzer şekilde kullanıldığı bildirilmiştir.

Hindistan’ın Assam eyaletinde halk tıbbında kullanılan hayvan türlerinin incelendiği bir araştırmada; *Perionyx* spp. (Perrier, 1872) adlı solucan türü, oral yoldan pnömونيye karşı, 3 adetinin ezilerek tuzla karıştırılması ve günde 2 kere yenilmesi şeklinde kullanılmaktadır (Borah ve Prasad, 2017). Aynı eyalette, *Metaphire houletti* (Perrier, 1875) adlı solucan türünün ise su ile kaynatılıp, tuz ilave edilerek vokal kord enfeksiyonuna karşı oral yoldan tüketildiği kaydedilmiştir.

Doğu Tıbbı İleri Araştırma Entegre Sistemi’ne (Oriental Medicine Advanced Searching Integrated System, OASIS) göre; Kore geleneksel tıbbında solucan türleri yüksek kan basıncı, ödem, hemipleji, epilepsi, konvülsiyonlar, mani, uyuşma ve bilinç kaybına karşı kullanılmaktadır (Moon ve Kim, 2018). Ayrıca solucanlar, çeşitli yosunlarla birlikte pellet haline getirilerek bebek maması olarak da tüketilmektedir (Shen, 2010).

2.3. *Eisenia foetida*’da Bulunan Metabolitler

Enzimler

Pek çok araştırma solucanların özellikle fibrinolitik enzimler açısından zengin canlılar olduğuna işaret etmektedir (Grdisa vd., 2009). Solucanlardan fibrinolitik enzimlerin izolasyonuna 1980’lerde başlanmıştır. Fibrinolitik ve trombolitik etkili ilk enzim olarak; öncelikle *Lumbricus* türlerinden olmak üzere solucanlardan lumbrokinaz saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Solucan fibrinolitik enzimlerinin yüksek stabiliteye sahip oldukları,

organik solvanlara ve yüksek ısıya dirençli oldukları da tespit edilmiştir (Yuan vd., 2006). Bu nedenle, solucanlarda bulunan fibrinolitik enzimlerin trombozis, kardiyak ve serebrovasküler pıhtılaşmaya bağlı hastalıkların tedavisinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Hâlihazırda fibrinolitik ajanlar olarak kullanılan streptokinaz, ürokinaz ve plazminojen aktivatörünün fibrine spesifitesi düşük olup, bazı yan etkilere sahiptir ve maliyeti yüksektir. Bu faktörler göz önüne alındığında; solucan kaynaklı fibrinolitik enzimlerin saf formda olabileceği gibi, solucan homojenatı veya solömik sıvısı (coelomic liquid) formunda da bahsi geçen fibrinolitik ajanların alternatifleri olarak değerlendirilmeleri mümkün olabilir. Diğer yandan bu enzimlerin gıda ve hayvancılık endüstrilerinde de kullanılabileceği de belirtilmektedir (Nakajima vd., 2000). Annelid grubu solucanlardan olan *E. foetida* da enzimler, peptitler ve proteinler açısından oldukça zengin bir türdür ve bu konuda solucan üzerinde yapılan çalışmalara örnekler ilerleyen kısımlarda verilmektedir.

E. foetida'dan elde edilen ilk enzimlerden biri fosfojen kinazlar grubundan lombrisin kinaz olup, solucanın vücut kaslarından elde edilen homojenattan hareketle, amonyum sülfat ile fraksiyonlanarak, Ultrogel AcA 34 ZLKB jel filtrasyon ve dietilaminoetil (DEAE)-5PW iyon değiştirici kolon kullanılarak saflaştırılmıştır (Suzuki vd., 1997). Enzimin aminoasit sekansı otomatize protein dizilimcisi ile belirlenmiş, dimerik olduğu ve molekül ağırlığının 40 kDa olduğu bulunmuştur. Enzimin N-terminalinin sekansının prolin, lizin, fenilalanin, tirozin, alanin, arjinin, glutamin, asparajin, fenilalanin, prolin, aspartik asit, tirozin, lizin, serin ve asparajinden oluştuğu belirlenmiştir.

Çin'de yaşayan *E. foetida* örneğinden “solucan fibrinolitik enzim komponent A” (earthworm fibrinolytic enzyme A, EFEa) adı verilen, plazminojeni aktive eden, ancak fibrini doğrudan parçalayan bir enzim izole edilmiştir (Tang vd., 2002). EFEa'nın kristal yapısı çoklu izomorfoz replasmanı (multiple isomorphous replacement, MIR) yöntemi ile tayin edilmiş ve kemotripsin-benzeri serin proteaz tipi polipeptit katlanmasına ve elastaz enziminde karakteristik olan S1 spesifite belirleyicilerine sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca EFEa'nın geniş bir substrat spesifitesi olduğu ve dual fibrinolize yol açtığı gösterilmiş ve böylece EFEa'nın, annelid grubu solucanlardaki ilk serin proteaz olduğu bildirilmiştir. Çin'de yaşayan *E. foetida* örneklerinden ise fibrinolitik enzim-3 (earthworm fibrinolytic enzyme-3, EFE-3) elde edilmiş ve EFE-3'ün olgun formunu kodlayan cDNA, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real time polimerase chain reaction, RT-PCR)

ile amplifiye edilmiştir (Dong vd., 2004). Buna göre, moleküler klonlama uygulanan komplementer DNA'nın (complementary DNA, cDNA) sinyal dizisi de dahil olmak üzere 247 aminoasit biriminden oluşan bir proteini kodlayan 741 nükleotitten oluştuğu saptanmıştır. Elde edilen bulgular, EFE-3'ün bir başka solucan türü olan *Lumbricus rebus* proteazlarından F-III-1 ve F-III-2 ile sığır tripsinine yüksek oranda homoloji gösterdiğine işaret etmiştir.

Çin'in Hebei eyaletinde kültürü yapılan 2 aylık *E. foetida* örneklerinin amonyum sülfat ile çöktürülmesi ve akabinde Sefaroz 4B kolonu kombine edilmiş afinite kromatografisi ile DEAE-selüloz-52 kolon kombine edilmiş iyonik kromatografi yöntemi kullanılarak, EfP-0-1, EfP-0-2, EfP-I-1, EfP-I-2, EfP-II-1, EfP-II-2, EfP-III-1 ve EfP-III-2 adlı 8 adet fibrinolitik etkili tripsin-benzeri glikoproteazlar elde edilmiştir (Wu vd., 2007). Aynı araştırma grubunun benzer çalışmasında, Çin'den toplanan *E. foetida* örneklerinden EfP-II ve EfP-III-1 izole edilmiş ve substrat spesifiteleri tayin edilmiştir (Zhao vd., 2007).

Japonya'dan toplanan *E. foetida*'nın deri salgısı olan solömik sıvıdan serin proteaz (SP) tipinde bir enzim izole edilmiş ve "EF-SP1" olarak adlandırılmıştır (Ueda vd., 2008). Enzimin N-terminal aminoasit sekansının, daha önce *E. foetida* ve *Lumbricus rubellus*'tan elde edilen SP'larla homoloji gösterdiği saptanmıştır. Özellikle protein izolasyonunda kullanılan sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) yöntemi ile enzimin molekül ağırlığının 27.000 Da olduğu ve 40-50°C'de ve pH 9,5'ta en yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Aynı araştırma grubu tarafından yürütülen çalışmanın devamında, *E. foetida*'nın solömik sıvısından yeni bir serin proteaz (EF-SP2) daha izole edilmiş, ancak EF-SP2'nin N-terminal aminoasit sekansının EF-SP1'den farklı olduğu tespit edilmiştir (Ueda vd., 2011). Yine SDS-PAGE yöntemi ile enzimin molekül ağırlığının 26.000 Da olduğu; optimum sıcaklık ve pH değerinin ise 60°C ve 9,5 olduğu belirlenmiştir. Ueda vd. (2010) tarafından başka bir çalışmada, *E. foetida*'nın solömik sıvısından, solucanın yaşayabildiği sıcaklık olan 10-25°C arasında olduğu göz önüne alındığında; soğuğa-dayanıklı selülaz tipi bir enzim kompleksi daha izole edilmiştir. "EF-CMCaz25" olarak adlandırılan bu enzim kompleksinin β -glukozidaz, β -1,3 glukanaz ve β -ksilozidaz tipi enzimlerden oluştuğu, jel filtrasyon kromatografisi tekniği ile izole edilen EF-CMCaz25'in molekül ağırlığının 150 kDa, optimum sıcaklığının 15°C ve pH'nın ise 5 olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar

tarafından EF-CMCaz25'in Annelida şubesine mensup canlılardan izole edilen ilk selüloz olduğu bildirilmiştir.

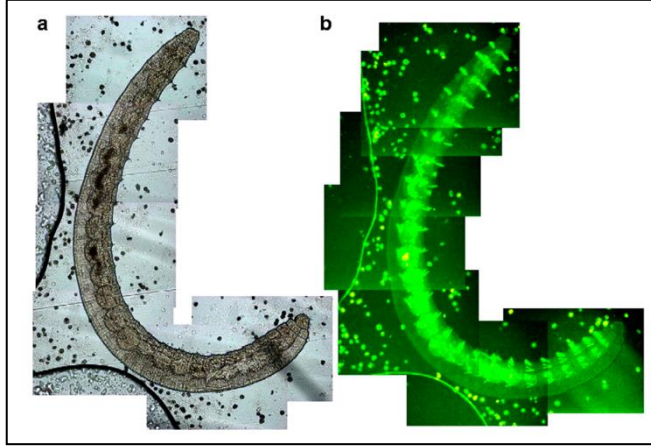
Çin'de yaşayan *E. foetida* türü solucanların yetişkin bireyleri, deney anında -20°C'de 30 dk tutularak immobilize edilmiş, yıkanmış, disekte edilmiş ve içleri çıkarılmıştır (Chen vd., 2011). Elde edilen solucan biyokütlesine jel filtrasyon kromatografisi uygulanarak, lösin aminopeptidaz tipi bir enzim izole edilmiştir. Enzim matriks-destekli lazer dezorpsiyon uçuş iyonizasyon zamanı kütle spektrumu (matriks-assisted lazer desorption ionization time of flight massspectrometry, MALDI-ToF-MS) tekniği ile 98 kDa ağırlığında ve tek zincirli bir protein olarak karakterize edilmiş olup, optimum sıcaklık ve pH değerinin bu enzim için sırasıyla 45°C ve 7 olduğu bulunmuştur. Enzimin metal-şelasyon etkisine sahip ajanlar tarafından inhibe edilebilmesi nedeniyle, metal kofaktörünün çinko (Zn^{+2}) olduğu tespit edilmiştir. Yine Çin'den toplanan *E. foetida* örneklerinin sindirim kanalından afinite kromatografisi ile tripsin-benzeri bir proteaz tipi bir enzim grubu olan *E. foetida* proteazları (EfP-0-1, EfP-0-2, EfP-I-1, EfP-I-2, EfP-II-1, EfP-II-2, EfP-III-1 ve EfP-III-2) izole edilmiştir (Wu vd., 2007; Pan vd., 2011).

Çin'den toplanan ve dondurulan *E. foetida* örneklerinden hareketle hazırlanan homojenattan DEAE-selüloz iyon değiştirme ve sefakril S-200 HR jel filtrasyon kromatografisi ile izole edilen proteinin, fibrinolitik bir enzim olduğu sonucuna varılmış, SDS-PAGE tekniği ve sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) tekniği ile molekül ağırlığı 25 kDa olarak belirlenmiştir (Liu vd., 2017).

E. foetida dokularından elde edilen ve "G90" adı verilen glikoprotein ekstresi (40 µg protein/mg liyofilize toz) 1 g canlı solucandan 20 mg verimle (a/a) elde edilebilmektedir (Grdisa ve Hrzenjak, 2007). Glikoproteinlerin yanısıra, içeriğinde amino grupları, şekerler, lipitler, immünoglobulin (Ig)-benzeri proteinler, insülin-benzeri proteinler ve tirozin-benzeri serin peptidazlar da bulunmaktadır. G90 ekstresi, Hırvatistan Devleti Patent Ofisi tarafından "Procedure for its obtaining and its application in medicine" adı ile "P920481A" numarası ile patent altına alınmıştır (Hrzenjak vd., 1992).

E. foetida'ya elektrik akımı uygulanarak elde edilen solömik sıvının tarama elektron mikroskopu (scanning electron microscope, SEM) ile resimleri çekilmiş ve floresans

tekniki ile solucan tarafından salgılanan solömik veziküllerin elastisite özelliği belirlenmiştir (Heredia vd., 2008) (Resim 2.7.).



Resim 2.7. *E. foetida*'nın SEM ile çekilen anatomik yapısı a) Sindirim borusu, gövde ve tüyler b) Sindirim borusu, solömik boşluk ve sekresyon vezikülleri (Heredia vd., 2008)

Hindistan'ın Tamul Nadu bölgesinde kültürü yapılan *E. foetida* örnekleri enzimleri açısından incelenmiş ve amilaz, selülaz, ksilanaz, sellobiaz, endoglukanaz, asit fosfataz, alkalın fosfataz ve nitrat redüktaz içerdiği saptanmıştır (Prabha vd., 2007). Japonya'nın Hokkaido bölgesinden temin edilen *E. foetida* örnekleri dondurarak kurutulmuş, havanda toz edilmiş ve yeni ham nişasta hidroliz edebilen ve soğuğa-dayanıklı α -amilaz tipi enzimler olan Amy-I ve II izole edilmiştir (Ueda vd., 2008). SDS-PAGE metoduyla enzimlerin molekül ağırlıkları 60.000 olduğu, bu enzimler için en aktif oldukları şartların pH 5,5 ve sıcaklığın 50°C olduğu da belirlenmiştir. Yine aynı grup tarafından *E. foetida*'dan 1,3- β -D-glukanaz adlı enzim de izole edilmiş ve SDS-PAGE metoduyla enzimin molekül ağırlığının 42.000, bu enzim için en aktif olduğu şartların pH 6 ve sıcaklık 60°C olduğu da saptanmıştır (Ueda vd., 2011).

Aminoasitler, peptitler ve proteinler

Kanada'da bir üretme çiftliğinden temin edilen 24 adet olgun *E. foetida* örneği sıvı azot içinde dondurularak liyofilize edilmiş, sonrasında santrifüje tabi tutularak homojenize edilen dokular fosfat tamponu ile tüketilmiştir. ¹H-NMR (500 MHz) ile metabolit analizi yapılmış ve maltoz, betain, glisin ve glutamatın yanısıra valin, lösin, alanin, lizin, tirozin ile fenilalanin içerdiği tespit edilmiştir.

Hayvansal proteinler içinde solucan proteinleri de önemli bir paya sahiptir. Bu nedenle özellikle balık, domuz ve tavuk yemi olarak da kullanılmaktadırlar (Zhenjun vd., 1997; Kolesnyk vd., 2018). Çin’de özellikle *E. foetida*, *Allolobolphora caliginosa* ve *Pheretima guillemi* türü solucanların bu amaçla geniş ölçekte kültürü yapılmaktadır. Bu kısımda *E. foetida*’da bulunduğu saptanan peptit ve protein türevlerinden bahsedilecektir.

Japonya’da yaşayan *E. foetida* türü 3000 adet solucandan (yaklaşık 1 kg) hareketle bağırsakları çıkarılmış ve sıvı azot içinde muhafaza edilmiştir (Ukena vd., 1995). Dondurulan bağırsak kütlesi (yaklaşık 100 g) bazı ara işlemlerden sonra homojenize edilmiştir. Homojenat santrifüje tabi tutularak, elde edilen süpernatant C-18 Sep-Pak kolon kromatografisine tatbik edilmiş ve fraksiyonlardan izole edilen ve ters faz-yüksek performans sıvı kromatografisi (high performance liquid chromatography, HPLC) ile saflaştırılan peptitin sekans analizi hızlı atom bombardımanı-kütle spektrumu (fast atom bombardment-mass spectrometry, FAB-MS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sekansı histidin, glisin, fenilalanin, lizin, aspartik asit, glisin, alanin, alanin, aspartik asit, arjinin, izolösin, serin, histidin, glisin ve fenilalanin olarak karakterize edilen peptit “*E. foetida* tetradekapeptiti” (ETP) olarak adlandırılmıştır. Bu peptitin Annelida şubesine mensup canlılardan izole edilen ilk miyoaktif tetradekapeptit (myoactive tetradecapeptide, MATP) olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda ETP’nin immünoreaktif bir protein olduğu da saptanmıştır (Ukena vd., 1997). *E. foetida*’nın çeşitli kas hücrelerinde “troponin” adlı proteinin de varlığı ve molekül ağırlığının 55 kDa olduğu tespit edilmiştir (Royuela vd., 1996).

Çin’in Shandong eyaletindeki Laiyang şehrindeki bir kültür çiftliğinden temin edilen *E. foetida* canlı örnekleri (yaklaşık 280 adet) homojenize edilerek, proteinaz ile hidrolize edilmiş ve protein miktarı canlı örnekte %11,04, homojenatta %54,6; yağ oranı ise canlı örnekte %1,89; homojenatta %7,34 olarak tayin edilmiştir (Zhenjun vd., 1997). Elde edilen proteinde; aminoasit yüzdeleri de treonin %2,72, serin %2,71, glisin %3,12, sistein %0,42, valin %2,39, metiyonin %1,01, izolösin %2,40, lösin %3,94, tirozin %1,73, fenilalanin %2,12, lizin %4,26, histidin %1,36 ve arjinin %3,27 şeklinde belirlenmiştir.

Annelid peptitleri grubunda, *E. foetida* ve diğer bazı solucan türleri ile sülük türlerinden “solucan uyarıcı peptitler” (earthworm excitatory peptides, EEP) olarak bilinen ve solucan bağırsağındaki kontraksiyonları uyaran bazı miyotropik peptit türevleri de elde edilmiştir.

Bunlar genellikle 17-18 aminoasitten oluşmakta ve C-terminalinde glisin içermekte olup, “GGNG peptitleri” olarak da adlandırılmaktadır. (Oumi vd., 1995) tarafından yapılan bir çalışmada, Hiroşima’da satın alınan *E. foetida* örneklerinin (yaklaşık 3000 hayvan, 1 kg) bağırsaklarından ve tam organizmasından hareketle ekstreler hazırlanmıştır. Ekstreler için solucanların bahsi geçen kısımları sıvı azotta pulverize edilmiş, akabinde %4 asetik asit ile kaynatılmış ve homojenize edilmiştir. Homojenatlar santrifüj edilmiş, süpernatant kısımları toplanmış, C18 Sep-Pak kartuştan geçirilmiş, C18 kolon ile kombine edilmiş HPLC’ye uygulanmış ve 3 adet peptit izole edilmiştir. Molekül ağırlıkları ise FAB-MS ile 1756,0, 1598,0 ve 1824,0 Da olarak tayin edilen ve 17-18 aminoasitten oluştuğu belirlenen miyoaktif peptitler, “GGNP peptitleri 1-3” olarak adlandırılmış ve *E. foetida*’nın sindirim ve üreme faaliyetlerinde rol oynadığı bildirilmiştir. Aynı araştırma grubunun bir sonraki çalışmasında, EEP’lerin izole edildiği solucan *E. foetida*’daki EEP reseptörlerini radyoreseptör tahlili ile karakterize etmek için radyoligantları hazırlanmıştır (Niida vd., 1997). [¹²⁵I] Bolton Hunter (BH)-EEP’lerin solucan dokusunun (ekin-taşlık) membran preparatına bağlanmasının tersine çevrilebilir (reversibl), doyurulabilir ve spesifik olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuç, solucan üzerinde EEP’lerin spesifik biyolojik aktivitesini açıklamaktadır. Buna göre; özofagus, ekin, taşlık ve nefridia dahil olmak üzere solucanın sindirim sisteminin ön kısmında bağlanma kapasitesinin daha yüksek olduğu ve EEP’lerinin bağırsak dokuları üzerinde gözlemlenen miyotropik aktivitesi ile birlikte, *E. foetida*’da bağırsak hareketliliğinin düzenlenmesinde fizyolojik olarak etkili olduğu belirlenmiştir. GGNG peptitlerini kodlayan cDNA’lar izole edilerek, prekürsör proteinlerin aydınlatılmasının amaçlandığı bir çalışmada, prekürsör yapıların GGNG peptitlerinden oldukça farklı olduğu tespit edilmiştir (Minakata vd., 1999).

Japonya’da temin edilen *E. foetida* örneğinin solömik sıvısından anyon değişimi-HPLC ile bir protein elde edilmiş ve 297 aminoasitten oluşan toksik etkili bu proteine “lizenin” adı verilmiştir (Sekizawa vd., 1996; Yamaji vd., 1998; Kwiatkowska vd., 2007). SDS-PAGE yöntemi ile aynı zamanda bir toksin olarak da nitelendirilen hemolitik etkili lizeninin, molekül ağırlığının 41 kDa olduğu ve sekansının asparajin, treonin, serin, glutamik asit, prolin, glisin, alanin, sistein, valin, metiyonin, izolösin, lösin, tirozin, fenilalanin, histidin, lizin, arjinin ve triptofan içeren 297 adet aminoasitten meydana geldiği tespit edilmiştir (Sukumwang ve Umezawa, 2013). Bir diğer çalışmada, Japonya orjinli 20 adet *E. foetida* örneğinin solömik sıvısı ayrıştırılarak, amonyum sülfat ile çöktürülmesinden sonra G2000SW kolon ile kombine edilmiş anyon-değiştirici HPLC

yöntemi ile izole edilen ve SDS-PAGE tekniği ile karakterize edilen lizeninin molekül ağırlığı 33 kDa olarak verilmiştir (Kobayashi vd., 2004). Lizeninin, *E. foetida*'nın tiflozollarında bulunan serbest kloragositler ile koelomositlerinde üretildiği, spesifik olarak hücre membranlarındaki ana lipit bileşeni (yaklaşık %60'ı) olan sfingomiyelinlere (*N*-açılsfingozin-1-fosforilkolin) bağlandığı, ancak diğer fosfolipitler ile etkileşmediği saptanmıştır. Bu nedenle “sfingomiyelin-bağımlı sitolitik toksin” olarak adlandırılmaktadır ve sfingomiyelinlerle etkileşmesi için triptofan ünitesinin gerekli olduğu saptanmıştır (Kwiatkowska vd., 2007). Lizeninin *E. foetida*'nın özellikle büyük koelomositlerinde sentezlendiği ve depolandığı belirlenmiştir (Sekizawa vd., 1996). Hedef hücrelere bağlandıktan sonra lizenin, hidrodinamik çapı 3 nm olan deliklerle karakterize sfingomiyelin-bağımlı oligomerler meydana getirmekte ve eritrositlerde lizisi tetiklemektedir. Sfingomiyelin-tipi lipozomlar ile inkübe edildiğinde, lizenin aktivitesinin bir kısmını kaybetmektedir. Diğer yandan, lizenin son derece letal olup, intravenöz enjeksiyondan birkaç saniye sonra fareleri öldürdüğü ve *ex vivo* ortamda kana eklenmesi ile kırmızı kan hücrelerini hemen yok ettiği bildirilmiştir (Kobayashi vd., 2003). Lizeninin letal etkisinin ise trombüs oluşumunun neden olduğu solunum zorluğunun yanısıra trombositlerin ve eritrositlerin plazma zarlarında lizeninin sfingomiyelinler ile bağlanmasıyla meydana gelen hemolize bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (Ohta, Wake ve Kobayashi, 2002).

Fransa'da yapılan bir çalışmada (Rouyela vd.,1999), *E. foetida*'nın düz kasları (100 mg) çıkarılmış ve Western blot yöntemi ile enzim-bağlantılı immüno-ölçüm (enzyme-linked immunoassay, ELISA) analizi ile “ α -aktinin” adlı mikrofilament proteini elde edilmiştir. Çek Cumhuriyeti'nden toplanan *E. foetida* örneklerinden elde edilen solömik sıvının ise 42 kDa molekül ağırlığına sahip bir protein olan solömik sitolitik faktör-1'i (coelomic cytolytic factor-1, CCF-1) taşıdığı belirlenmiştir (Bilej vd., 1998; Beschin vd., 1998). CCF-1'in profenoloksidaz kaskadında rol oynadığı, Gram-negatif bakteriler ve mayaların hücre duvarlarında bulunan β -1,3-glukanlara ve lipopolisakkaritlere bağlanarak, *E. foetida*'nın mikroplara karşı korunmasında fonksiyonu olduğu bildirilmiştir (Beschin vd., 1998). Çin'de yaşayan *E. foetida*'dan sırasıyla, amonyum sülfat ile çöktürme, ultrafiltrasyon, DE-52 iyon değiştirme kromatografisi, Sefadex G-10 kolon kromatografisi ve ters-faz (C-18) HPLC teknikleri kullanılarak; “OEP3121” olarak adlandırılan, kısa zincirli ve antimikrobiyal etkili bir peptit elde edilmiştir (Liu, Sun, Wang, Li ve Liu, 2004).

Moleküler ağırlığı MALDI-ToF-MS ile 510,8 Da olarak tespit edilmiş, ToF-MS-MS ile aminoasit sekanslaması (alanin-glutamat-serin-alanin-glisin) gerçekleştirilmiştir.

E. foetida'nın solöm sıvısı ve dokularında bulunan diğer bir protein grubu ise Ig'ler ve lektinlerdir (Rejnek vd., 1991; Tuckova vd.,1991). Bu solucan türünün "G-90" adı verilen ve glikoproteince zengin doku ekstresi, içeriğindeki makromoleküller olan Ig'ler ve lektinlere bağlı olarak çeşitli biyolojik aktiviteler göstermektedir. G-90 ekstresi Hrzenjak vd. (1992) tarafından SDS-PAGE yöntemi ile elde edilmiştir. Popovic vd.'nin (1998) çalışmasında, G-90 ekstresi poliakrilamit jel kromatografisine tabi tutulmuş, 17 adet protein fraksiyonu toplanmış, immünopresipitasyon ve Western blot teknikleri ile Ig-benzeri proteinler elde edilmiştir. G-90/4 olarak kodlandırılan ve adezif etkiye sahip oldukları saptanan bu Ig-benzeri proteinlerin molekül ağırlıklarının 14-97 kDa arasında olduğu ve *E. foetida*'nın lokomotor fonksiyonlarında rol oynadığı tespit edilmiştir.

Venezuela'dan toplanan *E. foetida* örneğinden protein fraksiyonu (%61,85) elde edilmiş, SDS-PAGE ile tek ve çift dimensiyonlu elektroforez teknikleri ile molekül ağırlıkları 6,9 ile 205 kDa arasında değişen 3 adet protein bulunduğu belirlenmiştir (Medina vd., 2003). Ancak çalışmada proteinlerin yapısına dair bilgi verilmemiştir.

Çin'de yaşayan *E. foetida* örneklerinin solöm sıvısından sırasıyla ultrafiltrasyon, jel kromatografisi ve iyon değiştirme kromatografisi teknikleriyle "ECFP" olarak adlandırılan bir protein elde edilmiş ve SDS-PAGE yöntemiyle molekül ağırlığının 38,6 KDa olduğu tespit edilmiştir (Hua, Wang, Cao, Pu ve Cui, 2011).

Mineral elementler

Çin'in Shandong eyaletindeki Laiyang şehrindeki bir kültür çiftliğinden temin edilen *E. foetida* örnekleri (yaklaşık 280 adet) canlı olarak ve homojenize edilmiş halde proteinaz ile hidrolize edilmiş ve kalsiyum oranının canlı örnekte %0,22, homojenatta ise %1,55 olduğu belirlenmiştir (Zhenjun vd., 1997). Venezuela'dan toplanan *E. foetida* örneği etüvde kurutulmuş ve elde edilen tozu ile homojenatındaki kurşun miktarının sırasıyla 2,5 ppm ve 0,08 ppm olduğu; civa miktarının ise solucanın tozunda 5,8 ppm olduğu homojenatında ise bulunmadığı bildirilmiştir (Medina vd., 2003).

Guayana'dan toplanan 2500 adet *E. foetida* örneğinin su ile yıkanıp, 55°C'de inkübatörde 24 saat boyunca kurutulması ile elde edilen tozda, çeşitli elementlerin miktarı nitrik asit ve sülfürik asit dijestiyon metodu ile tayin edilmiştir (Ansari ve Sitaram, 2011). Sonuçlar, *E. foetida*'nın kurutulmasıyla elde edilen tozun bileşiminde, azot (%0,92), fosfor (%0,49), potasyum (%48), demir (282,72 ppm), magnezyum (0,05 ppm), mangan (15,30 ppm), çinko (95,45 ppm), kalsiyum (0,13 ppm) ve bakır (8,11 ppm) olduğu saptanmıştır.

Kokulu bileşikler

Venezuela'da kültürü yapılan *E. foetida*'nın protein kısmı toz halde elde edilerek, gaz kromatografisi-olfaktometre analizi ile incelenmiş ve olfaktometrik olarak eşleştirilmiş bir şekilde; bileşiminde hekzanal (otsu), okt-1-en-3-on (mantar), linalol oksit (bitkisel), dekan-3-on (patates), alfa-gurjunen (sebze), undekan-2-on (çiçeksi), 1-fenil-etanon (çiçeksi), hept-4-enal (balık), tridekan-2-on (mantar), nonanoik asit (tatlı), undekan-2-ol (anason), hekzanoik asit (keskin, asitsi), hekzan-1-ol (topraksı), nonanal (sarımsak), 2-metilpropanoik asit (topraksı), 2,6-dimetil-sikloheksanol (topraksı), alfa-humulen (ayak), benzil alkol (keskin, asit), oktanal (meyvemsi), 2-asetilfuran (hayvan yemi), fenilasetaldehit (ayak), dodekan-2-on (çiçeksi), 2-etil hekzanoik asit (çiçeksi), dekan-2-ol (ayak), dodekanoik asit (sabun), pentanoik asit (ayak) ve 2-feniletanol (toz) gibi bileşikler tespit edilmiştir (Bou-Maroun ve Cayot, 2011).

Fosfolipitler

Çeşitli araştırmacılar tarafından, *E. foetida*'nın, alkilaçilgliserofosfokolin (kolin gliserofosfolipitlerin %61,3'ü) ve alkenilaçilgliserofosfoetanolamin (etanolamin gliserofosfolipitlerin %66,0'sı) gibi eter içeren fosfolipitleri yüksek oranda taşıdığı gösterilmiştir (Sugiura vd., 1991). Ayrıca bu solucan türünde platelet-aktive edici faktör (PAF)-benzeri lipitlerin varlığı, ancak insan fosfolipitlerinden yapısal farklılık gösterdiği de tespit edilmiştir.

2.4. *Eisenia foetida* Üzerinde Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Antimikrobiyal aktivite

Solucanlar bol miktarda patojen bulunan ortamlarda yaşarlar. Bu patojenler, ilk olarak beslenme sırasında yutulan veya yaralanmadan sonra vücuda giren su veya toprakta yaşayan bakterilerdir. Solucanlar bu patojenlere karşı gelişmiş savunma stratejileri geliştirmişler olduklarından, güçlü antimikrobiyal aktivite gösterme potansiyeline sahiptirler. *E. foetida*'dan izole ve karakterize edilen iki yeni antibakteriyel peptit olan F-1 ve F-2'nin, sadece bakterilere değil, aynı zamanda funguslara karşı da antibakteriyel aktivite gösterdiği görülmüştür. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı F-1 ve F-2'nin seri dilüsyonları mikrotiter plaklarda inkübe edilerek, minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. *Enterococcus gallinarum*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella terrigena*'ya karşı F-1 ve F-2'nin MİK değerleri sırasıyla 11,4 mg/L ve 12,85 mg/L iken, *Enterococcus faecalis*'e karşı F-1 ve F-2'nin MİK değerleri 22,8 mg/L ve 25,68 mg/L olarak tayin edilmiştir (Xichun vd., 2002).

Hırvatistan'da kültüre alınan *E. foetida* örneğinden hazırlanan G90 ekstresinin antibakteriyel etkisi *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle incelenmiştir (Popovic vd., 2005). *In vitro* olarak ekstre non-patojenik (*Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum* ve *Azotobacter chroococcum*) ve patojenik bakteri kültürlerine (*Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pyogenes*) karşı agar disk difüzyon metodu ile test edilmiş, disklere 10 ng/mL ve 10 µg/mL konsantrasyonda ekstre ile referans olarak kullanılan 10 µL konsantrasyonda at serumuna eklenmiştir. G90 ekstresi için en iyi bakteriyostatik etki 10 µg/mL'de patojenik bakteri suşlarına karşı gözlenmiş olup, etkinin non-patojenik suşlara karşı %21 daha güçlü olduğu belirlenmiştir. Ekstrenin antibakteriyel etkisi 3 haftalık NHI soyu sağlıklı erkek fareler eter inhalasyonu ile anestezide edilerek, lumbosakral bölgelerinde ekzizyon modeli ile yara oluşturulmuştur. Bu yaralardan her 24 saatte bir sürüntü alınarak, 5 grupta incelenmiştir. Fareler; 1. grup negatif kontrol, 2. grup 25 µL fizyolojik solüsyon (G90 için çözücü), 3. grup pantenol-D (pozitif kontrol), 4. grup yara başına 25 µL G90 ekstresi (10 µg/mL) ve 5. grup (10 ng/mL) olmak üzere tasnif edilmiştir. Alınan sürüntüler agar vasatı içinde petri kaplarına inoküle edilerek, 24 saat 37°C'de inkübe edilmiş, *Staphylococcus* bakteri kültürlerindeki etkisi, koloni oluşturan ünite (colony-forming unit, cfu)/mL değeri üzerinden referans ilaçlar olarak gentamisin ve

enroflokzasin kullanılarak tayin edilmiştir. G90 ekstresi 14 günlük periyottan sonra hem 10 ng/mL hem de 10 µg/mL konsantrasyonlarda yaralardaki bakteriyal proliferasyonu inhibe etmiş ve sonraki günlerde bakteriyal proliferasyon gözlenmemiştir. Bulgulara göre; G90 ekstresinin güçlü bir antibakteriyal ajan olabileceği sonucuna varılmıştır.

Guayana’da yaşayan 2500 adet *E. foetida* örneği toplanarak su ile yıkanmış, petri kaplarına konularak 55°C’de inkübatörde 24 saat boyunca kurutularak toz edilmiştir (Ansari ve Sitaram, 2011). Toz halinden hareketle distile su ile 1:1, 1:2 ve aseton ile 1:2 oranında dilüsyonları hazırlanmış ve *S. aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*’ya karşı antibakteriyel, *Candida albicans*’a karşı ise antifungal aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile Müller Hinton agar vasatında test edilmiştir. Bahsi geçen bakteri suşlarına karşı ekstreler inaktif bulunmuş, ancak *C. albicans*’a karşı inhibisyon zon çapları distile su 1:1 ve 1:2 dilüsyonları için 35 mm ve 13 mm; aseton (1:2) dilüsyonu için 10,6 mm olarak bulunmuştur. Çalışmada referans ilaç kullanılmamıştır.

Pakistan’ın Muzaffarabad, Azad Jammu ve Keşmir bölgelerinden toplanan *E. foetida* örnekleri 55°C’de inkübatörde 48 saat boyunca kurutularak toz edilmiş ve dietileter, kloroform, metanol ve etanol ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur (Aandleeb vd., 2016). Diğer yandan aynı çalışmada, canlı *E. foetida* örneklerinin “mukus” olarak da bilinen solömik sıvısı toplanmış ve 3 gün sonra toplanan örnek “mukus-I”, 6 gün sonra toplanan örnek “mukus-II”, 9 gün sonra toplanan örnek “mukus-III” ve 12 gün sonra toplanan örnek ise “mukus-IV” olarak adlandırılmış ve homojenize edilmiştir. Ekstreler ve homojenatlar *Klebsiella pneumonia*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *E. coli*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *C. albicans* ve *Penicillium notatum*’un klinik izolatlarına karşı test edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite için disk difüzyon metodu kullanılmış, genel olarak mukus homojenatları, ekstrelerden daha etkili bulunmuştur. Örneğin mukus-IV *Klebsiella pneumonia*’ya karşı $30,33 \pm 1,53$ mm; dietileter ekstresi $22,33 \pm 19,39$ mm, kloroform ekstresi $10,33 \pm 2,52$ mm, etanol ekstresi 18 ± 2 mm ve metanol ekstresi $17,33 \pm 15,04$ mm inhibisyon zon çapına yol açmıştır. Antibakteriyel aktivite testlerinde referans ilaç kullanılmamış, antifungal aktivite testlerinde ise nistatin (30 µL) referans ilaç olarak kullanılmıştır. Mukus ekstreleri, tüm fungus suşlarına karşı ekstrele göre daha iyi antifungal aktivite göstermiş; hatta mukus I-IV, *C. albicans* dışındaki diğer fungus türlerine karşı nistatinden daha geniş inhibisyon

zonu oluşturmuştur. Bu nedenle *E. foetida* solömik sıvısının doğal kaynaklı iyi bir antimikrobiyal ajan alternatifi olabileceği ifade edilmiştir.

E. foetida'nın solöm sıvısının ve Sefakril S-1000 kolon kombine edilmiş jel filtrasyon kromatografisi ile fraksiyonlanması ile elde edilen 5 adet fraksiyonun mürin splenositlerinde konkanavalin A ile oluşturulan hasara karşı etkisi incelenmiş ve 5. fraksiyonun mitojenik aktivite gösterdiği saptanmıştır (Hanusova vd., 1999). Fraksiyon daha ileri kimyasal analize tabi tutulduğunda, 60 kDa molekül ağırlığına sahip bir protein elde edilmiş ve solömik mitojenik faktör (coelomic mytogenic factor, CMF) olarak adlandırılmıştır. CMF'nin N-terminal aminoasit sekansının fosfolipaz A2 ile benzer olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle CMF'nin konkanavalin A'ya bağlanma özelliği ile *E. foetida*'nın antibakteriyal ve anti-enflamatuvar savunmasında önemli rolü olduğu bildirilmiştir.

Çin'de yaşayan *E. foetida* örneklerinin solöm sıvısından elde edilen "ECFP" adlı proteinin *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkisi turbidite kolorimetri testi ile Oxford kap tabaka testi kullanılarak incelenmiş ve sırasıyla MİK değerleri 90 ve 45 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Hua vd, 2011). Çalışmada referans ilaç kullanılmamıştır.

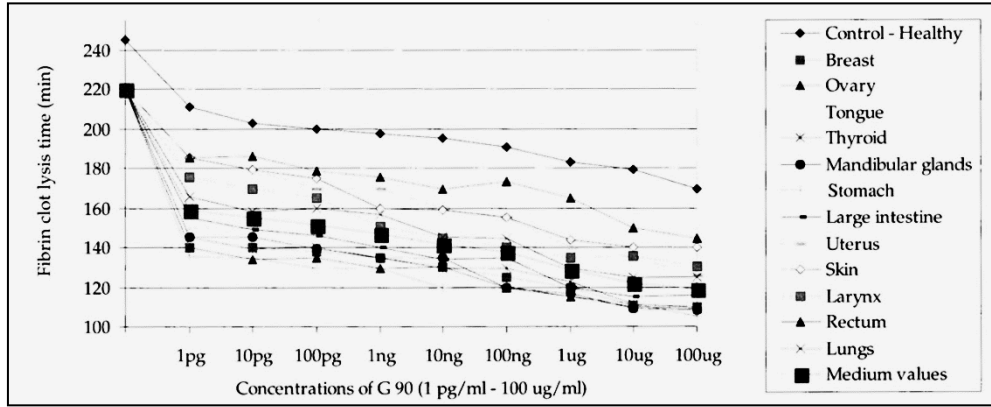
Antiviral aktivite

Japonya'dan toplanan *E. foetida*'nın solömik sıvısından izole edilen EF-SP1'in, salatalık mozaik virüsü (cucumber mosaic virus, CMV) ve domates mozaik virüsüne (tomato mosaic virus, TMV) karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Ueda vd., 2008). Aynı araştırma grubu tarafından solöm sıvısından izole edilen diğer enzim olan EF-SP2'nin de aynı virüslere etkili olduğu saptanmıştır (Ueda vd., 2011).

Fibrinolitik, antiplatelet ve antikoagülan aktivite

E. foetida'da fibrinolitik etkili enzimlerin varlığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Fibrinoliziste rol oynayan plazminojen aktivatörleri solucanlıların da dahil olduğu omurgasız canlılarda da bulunmaktadır. *E. foetida* dokularından elde edildiğinde yukarıda bahsettiğimiz "G90" adlı glikoprotein ekstresi, fibrinolitik ve antikoagülan özelliklere sahip olan ve PI (32 kDa) ve PII (23 kDa) olarak bilinen iki SP içermektedir.

Hırvatistan'da yapılan bir çalışmada, primer malign tümör hastalarından alınan kan plazması örneklerindeki fibrin pıhtılarına öglobulinik testler ile G90 ekstresi, PI ve PII uygulanmış, G90 ekstresinin fibrinolitik etkisinin konsantrasyon-bağımlı olmadığına, ancak tümörün lokalize olduğu dokularla yakından ilgili olduğuna işaret etmiştir (Hrzenjak vd., 1998) (Şekil 2.1.). PI ve PII kodlu enzimlerin de fibrinolitik etkilerinin olduğu, PI'in etkisinin ise daha kuvvetli olduğu tespit edilmiştir (Hrzenjak vd., 1998). G90 ekstresi, 1 pg/mL ile 100 µg/mL arasındaki konsantrasyonlarda denendiğinde; fibrinolizisi kontrol grubuna göre %36-44 oranında hızlandırmıştır. Ancak 100 µg/mL'den sonra denenen tüm konsantrasyonlarda hızlandırma oranı %55 olarak bulunmuştur. Elde edilen bulgulara göre, araştırmacılar G90 ekstresinin plazminojen aktivatörü etkiye sahip bileşikler taşıdığı sonucuna varmıştır.



Şekil 2.1. G90 ekstresinin malign tümörün lokalize olduğu dokulara göre fibrinolizis süresinin değişimi (Hrzenjak vd., 1998)

E. foetida'da bulunan lizenin adlı proteinin (1-100 ng/mL) akış sitometri analizi ile trombositlere konsantrasyon-bağımlı bir şekilde bağlandığını ortaya çıkarmıştır (Haruta vd., 2002). Ayrıca lizenin 1 µg/mL konsantrasyonda, trombositlerin tromboksan B1 oluşumu ile geri dönüşümsüz (irreversibl) agregasyonlarına neden olmuştur. Plateletlerin yüzeyinde P-selektin ve platelet endotel hücre adezyon molekülü-1'in (platelet endothel cell adhesion molecule-1, PECAM-1) ifadeleri, lizeninin (10-100 ng/mL) plateletler inkübasyonundan 5 dakika sonra artmıştır. Bu sonuçlar, hücre membranındaki sfingomiyelinin, trombositlerin lizenin tarafından aktivasyonunda rol oynadığını göstermektedir. Araştırmacılar tarafından, lizeninin platelet aktivasyon mekanizmalarını aydınlatmak için faydalı olabileceğine işaret edilmiştir.

Hırvatistan'dan toplanan *E. foetida* örneklerinin doku homojenatından elde edilen G-90 glikoprotein ekstresinin, yetişkin Wistar sıçanlara 7 gün boyunca intraperitoneal enjeksiyonu ile yapılan deneyde kanama ve pıhtılaşma süreleri üzerinde hematolojik ve hemostatik parametreler üzerinden kanama zamanını kontrol grubuna göre 2,5 kat uzatmak suretiyle belirgin etki (heparine benzer seviyede) göstererek yeni bir trombolitik ajan olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır (Matausic-Pisl vd., 2011). Ayrıca G-90 ekstresinin köpek ve insan kanındaki fibrin pıhtılarını da parçaladığı bildirilmiştir (Hrzenjak, Popovic ve Tiska-Rudman, 1998a; Cooper, Hrzenjak ve Grdiša, 2004).

Hemolitik aktivite

E. foetida'nın solömik sıvısının, kırmızı kan hücrelerinin parçalanmasına neden olan çeşitli proteinler (*Eisenia foetida* Andrei faktörü-EFAF, fetidin, lizenin, eiseniapor ve hemolizinler) içerdiği bildirilmiştir. Hemolitik *E. foetida* proteinleri ilk kez Du Pasquier ve Duprat tarafından 1968 yılında tanımlanmıştır (Du Pasquier ve Duprat, 1968). Daha sonra "EFAF" olarak adlandırılmış; 40 ve 45 kDa'lık iki glikoprotein olarak karakterize edilmişlerdir (Roch, Valembos, Davant ve Lassegues, 1981; Roch, 1984). Polimorfizm nedeniyle *E. foetida* bireylerinde 6 farklı hemolitik desen bulunmuştur (Roch, Valembos ve Lassegues, 1987). 1997'de 40 ve 45 kDa ağırlığındaki proteinlere "fetidin" adı verilmiş ve 40 kDa'yı kodlayan gen klonlanmıştır. Fetidin aminoasit dizisi, bir *N*-glikozilasyon bölgesi ve bir peroksidaz bölgesi içerdiği tespit edilmiştir. Fetidinler, çoğu memeli hücresinin plazma zarlarının ana lipit bileşeni olan sfingomiyeline bağlanmaktadır. Daha sonra polimerize olup, lipit çift tabakası boyunca 10 nm'lik kanallar oluşturmaktadırlar. Aynı zamanda, *E. foetida*'nın solömik sıvısında 38 kDa'lık bir başka sitolitik protein olan "eiseniapor" tanımlanmıştır. Bu protein, eritrosit zarlarına bağlanarak lizisi tetiklemek için sfingomiyelin veya galaktozilseramite ihtiyaç duymaktadır. Eiseniapor kararlı oligomerler oluşturmakta ve merkezi kanallı sfingomiyelin içeren zarlarda gözenekleri oluşturmaktadır. *E. foetida*'da, solömik sıvısından elde edilen H1, H2 ve H3 olarak adlandırılan, molekül ağırlıkları sırasıyla 46, 43 ve 40 kDa olan 3 hemolitik proteinin varlığı daha saptanmıştır. 2003 yılında, Koenig vd. hem koelomosit lizatından (CL39 ve CL41) hem de solömik sıvıdan (H1, H2, H3) doğal hemolitik proteinleri izole etmiştir (Koenig vd., 2003). Ayrıca kütle spektrometrik (KS) analizleri ile CL39'un fetidin ve CL41'in lizenin ile özdeş olduğunu ortaya koymuşlardır.

Yara iyileştirici aktivite

Hindistan'da yaşayan *E. foetida*'nın solömik sıvısının yara iyileştirici etkisi, 10-12 aylık Yeni Zelanda beyaz tavşanlarında incelenmiştir (Amarpal vd., 2015). Ksilazin-ketamin anestezisi altında, her grupta 4'er tavşan olacak şekilde 4 gruba ayrılan tavşanların dorsal cilt bölgesinde (2 x 2 cm²) eksizyon tipi yara oluşturulmuş; 1. grup solömik sıvı, 2. grup %0,5 povidon-iyot çözeltisi + solömik sıvı, 3. grup %0,5 povidon-iyot çözeltisi ve 4. grup ise tuzlu su ile muamele edilmiştir. Yaraların iyileşme süreci histomorfolojik analizlerle takip edilmiştir. 21 gün sonunda, 1. ve 2. grupta yer alan tavşanlardaki yara bölgesi, 3. ve 4. gruptaki tavşanlardaki yaralar ile mukayese edildiğinde, tamamen iyileşmiştir ($p<0,05$). Histomorfolojik analizler, 1. ve 2. gruptaki tavşanların yaralarında epitelizasyonun daha hızlı olduğu ve kolajen miktarının daha yoğun olduğuna işaret etmiştir. Bu nedenle araştırmacılar tarafından, *E. foetida*'nın solömik sıvısının yara iyileşme sürecini oldukça hızlandırdığı sonucuna varılmıştır.

İran'dan temin edilen *E. foetida*'dan elde edilen G90 ekstresinin, alloksan-nedenli diyabet modeli oluşturulan albino Wistar dişi sıçanlarda ekzizyon yöntemiyle açılan yara iyileşmesine etkisi incelenmiştir (Goodarzi vd., 2016). Sıçanlar; 1. grup pantenol-D (pozitif kontrol grubu), 2. grup enjeksiyon yoluyla G90 ekstresi, 3. grup diyet veya gavaj yoluyla G90 ekstresi, 4. grup yara alanına G90 ekstresi topikal uygulaması, 5. grup herhangi bir tedavi uygulaması yapılmayan diyabetik sıçanlar (negatif kontrol grubu) ve 6. grup sağlıklı sıçanlar (kontrol grubu) olarak 6 grupta tasnif edilmiştir. Sıçanlar 21 günlük deney periyodu boyunca uygulamaya maruz bırakılmış ve 3, 6, 9, 12, 15, 18 ve 21. günlerde yara çapı ölçülmüş ve daha sonra histopatolojik incelemeye tabi tutulmuştur. Bulgular, topikal uygulanan G90 ekstresinin pantenol-D ile eşdeğer oranda yara iyileşmesini hızlandırdığını, ekstrenin fibroblast proliferasyonu, neovaskülarizasyon ve kolajen sentezini hızlandırması ve epitelizasyonun daha erken oluşmasına bağlı daha iyi ekstraselüler matriks oluşumuna neden olmuştur. 1., 4. ve 6. gruplarda yaranın kapanma oranı sırasıyla 12. günde %65,84, %79,41 ve %81,33; 21. günde ise %98,65, %99,98 ve %100 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak, araştırmacılar tarafından G90 ekstresinin iyi bir yara iyileştirici ajan olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. G90 ekstresi ile yapılan benzer bir başka çalışmada, anestezisi altında 2 cm dairesel insizyon tipi yara oluşturulmuş Wistar sıçanlarında, ekstrenin etkisi pantenol D ile mukayese edilmiştir (Matausic-Pisl, Tomičić, Micek ve Grdisa, 2011). Yaralanmış sıçanlar 3, 6, 9, 12, 18 ve 24. günlerde

sakrifiye edilerek, yara çapları fotometrik yöntemle ölçülmüştür. Eksize edilen yaralar sabitlenmiş, parafine konularak histopatolojik analiz için boyanmıştır. Yaralarda mikroorganizma varlığı da değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre; en iyi antibakteriyel yara koruması G-90 tedavisi ile elde edilmiştir. Antibakteriyel korumanın yanı sıra G-90 ile tedavi edilen yaralar iltihaplanmadan da korunmuştur. G-90'ın enflamasyon sürecini kısalttığı, proliferatif ve maturasyon fazını hasarlı epiderminin rejenerasyonunu stimüle ederek hızlandırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle, *E. foetida* solucan ekstresi olan G90 hem veterinerlik hem de beşerî tıp uygulamalarında kullanıma uygun yeni bir yara iyileştirici ajan olarak önerilmiştir.

Analjezik ve anti-enflamatuvar aktivite

Çin'in Yunnan eyaletinden toplanan *E. foetida* örneklerinin dorsal epiderma kısmından elde edilen solömik sıvı Sefadeks G-50 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile fraksiyonlanmış ve elde edilen 5 fraksiyonun, kuyruk çekme (tail-flick) testi ile analjezik aktivitesi yetişkin farelerde incelenmiştir (Li vd., 2017). 4. Fraksiyonun en güçlü analjezik etkiyi gösterdiği tespit edilmiş ve Xbridge™ BEH300 kolon ile kombine edilmiş ters faz (C₁₈) HPLC ile analiz edilmiştir. Karakterize edilen piklerden 17. pik en güçlü analjezik etkiyi gösterdiğinden, tekrar Hypersil BDS kolon ile kombine edilmiş ters faz (C₁₈) HPLC'ye uygulanmış ve VQ-5 ile AQ-5 kodu verilen iki peptit izole edilmiştir. MALDI-ToF-MS ile [M+H]⁺ pikleri sırasıyla 519,277 ve 535,218 olarak saptanmıştır. VQ-5 ve AQ-5 kodlu iki peptit, kuyruk çekme testine tabi tutulmuş ve farelere 1,25, 2,5 ve 5 mg/kg (vücut ağırlığı, v.a.) dozlarda uygulanan AQ-5 doz- ve zaman-bağımlı şekilde analjezik etki göstermiştir. AQ-5'in sıcak plak (hot plate) testi, formalin-nedenli pençe yalama testi ve asetik asit-nedenli kıvrınma testinde de VQ-5'e göre çok daha yüksek analjezik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, araştırmacılar AQ-5'in opioit-benzeri analjezik etkili bir ajan olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada, karagen-nedenli arka ayak ödemi deneyinde de AQ-5, 5 mg/kg (v.a.) dozda etkili bulunmuş ve dokularda siklooksijenaz-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) seviyesini de azaltmıştır. Bu deneyde VQ-5 etki göstermemiştir. Diğer yandan yine bu çalışma kapsamında, sitokinler, kemokinler ve diğer immünoregülatör proteinler aracılığı ile oluşan immün ve enflamatuvar cevabın regülasyonunda ve lenfosit gelişmesinde mitojen ile aktive edilen protein kinazlar (mitogen-activated protein kinases, MAPK) rol oynamaktadır. Buna istinaden, RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde AQ-5 ve VQ-5'in ekstraselüler sinyal ile regüle edilmiş kinaz

(extracellular signa-regulated kinase, Erk1/2), p38 mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (mitogen-activated protein kinase, MAPK), c-Jun *N*-terminal kinaz (c-Jun *N*-terminal kinase, JNK), ve I kappa B kinaz α/β (I kappa B kinase α/β , IKK α/β) sinyal yollarının lipopolisakkarit (LPS) ile stimüle edilen fosforilasyonundaki etkisi incelenmiş ve bulgular AQ-5'in 4 ve 8 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda, Erk1/2'in LPS-nedenli aktivasyonunu inhibe etmiştir. Her iki peptidin de p38 MAPK'nın LPS-nedenli aktivasyonuna herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. Diğer yandan VQ-5, JNK'nın LPS-nedenli aktivasyonunu inhibe ederken, AQ-5 bu yolak üzerine etki göstermemiştir.

Antitümör ve sitotoksik aktivite

Özbekistan'dan toplanan *E. foetida* örneğinden (100 g) hazırlanan homojenat, Lichrorep C8 kolon kullanılarak hidrofobik kromatografi yöntemine uygulanmış, toplam protein fraksiyonu elde edilmiş ve bu fraksiyonun sitotoksik aktivitesi Ehrlich karsinoma hücre hattında tayin edilmiştir (Ziyavitdinov vd., 1994). Protein fraksiyonu [3H] timidinin DNA ve [3H] uridinin RNA sentezini sırasıyla %65,5 ve %52,3 oranında inhibe etmiştir.

Solucanların protein antijeni ile parenteral stimülasyonla cevap olarak antijen-bağlayan protein (antigen-binding protein, ABP) ürettiği bilinmektedir (Laulan vd., 1985). Çek Cumhuriyeti'nden toplanan *E. foetida* örneklerinin (100 g) solömik sıvıları toplanarak, koelomisitleri taşıyan hücre süspansiyonları ayrıştırılmıştır (Bilej vd., 1995). Bu süspansiyon ABP-insan serum albümini ile stimüle edilerek SDS-PAGE ve Western blot teknikleri uygulanarak miktarı tayin edilmiştir. ABP-insan serum albümini ile stimüle edilen solucanların solömik sıvısında ABP spesifitesinin arttığı belirlenmiştir.

Çek Cumhuriyeti'nde toplanan *E. foetida* örneklerinin solömik sıvısında bulunan CCF-1 miktarının, solucanlara parenteral endotoksin enjekte edildiğinde arttığı, akış sitometresi tekniği ile tayin edilmiş ve immünokimya deneylerinin de sonrasında molekül ağırlığı 42 kDa olan CCF-1'in hücre-aracılıklı sitotoksisite mekanizmasında rol oynadığı sonucuna varılmıştır (Bilej vd., 1995 ve 1998). Zira ortaya çıkan sitotoksik aktivite anti-CCF-1 monoklonal antibadi oluştuğunda bloke edilmiştir. CCF-benzeri moleküllerin, Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler ile fungusların hücre duvarında bulunan glukanlar ile lipopolisakkaritlerine bağlanarak *E. foetida* için bir savunma mekanizması oluşturmaktadır. CCF'lerin aynı zamanda profenolksidaz kaskatının aktivasyonunu da

tetikleyerek, antimikrobiyal aktivite ve sitotoksik aktivite gösteren melanin sentezini sağlayarak yine solucanın savunma mekanizmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Beschlin vd., 1998; Bilej vd., 2001). *E. foetida*'da makrofaj-benzeri koelomositler tarafından salgılanan CCF'lerin iki farklı lektin-bağlama alanı (domain) içerdiği belirlenmiştir (Bilej vd., 2001). Makrofajlardan salgılanan tümör nekroze edici faktör (tumor-necrosis factor, TNF) de lektin-bağlama alanı içermekte olup, hem TNF hem de CCF, β -1,3-glukanlar ile *N,N'*-diasetilkitobiyozlara bağlanma özelliğine sahiptir. Yine her iki proteinin de Afrika ve Amerikan tipi tripanozomları öldürdüğü tespit edilmiştir (Lucas vd., 1994; Magez vd., 1997; Olivares Fontt vd., 1998). Aynı grubun daha sonraki çalışmasında, *E. foetida*'da bulunan CCF'nin desen spesifitesinin diğer solucan türlerinden daha geniş olması ve *N,N'*-diasetilkitobiyozlara bağlanma özelliğine sahip tek solucan türü olması nedeniyle; mikrobiyal direncinin diğer solucan türlerinden çok daha yüksek olduğu bulunmuştur (Silerova vd., 2006). *E. foetida*'dan izole edilen "EFE" olarak bilinen solucan fibrinolitik enziminin HLE, Huh7, PLC/PRF/5 ve HepG2 hepatoma hücre hatlarında değişik konsantrasyonlarda hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi incelenmiş ve IC₅₀ değerleri sırasıyla 2,11, 5,87, 25,29 ve 17,30 ürokinaz ünitesi (urokinase unit, uku)/mL olarak hesaplanmıştır (Chen vd., 2007). Enzimin antitümör etkisi erkek BALB/c AnNCrj-nu türü tüysüz (nude) farelerde de araştırılmış, 500 uku/kg/gün and 1000 uku/kg/gün dozlarında, kontrol grubuna göre etkisi %46,08 ($P=0,026$) ve %57,52 ($P=0.002$) olarak tespit edilmiştir. EFE'nin apoptozu tetikleyici mekanizma üzerinden antitümör etki gösterdiği, ayrıca HLE ve Huh7 hücrelerinde, Western blot analizi ile ekspresyonu belirlenen matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) salınımını inhibe ettiği de bildirilmiştir.

E. foetida örneğinden hareketle elde edilen ve fibrinolitik bir enzim olduğu belirlenen bir proteinin enzimatik aktivitesi fibrin plaka yöntemi ile tayin edilmiş ve 40 μ g/mL konsantrasyonda antikanser aktivitesi MCF-7 hücre hattında test edilmiştir (Liu vd., 2017). Enzim ile muamele sonucunda 24 saat sonra apoptozisin başladığı gözlenmiş, fokal adezyon ve CD44v6 ekspresyonunun konsantrasyon-bağımlı (20-80 μ g/mL) olarak down-regüle edildiği ve MCF-7 hücre supresyonuna neden olduğu saptanmıştır.

E. foetida'nın solömik sıvısında bulunan lizenin adlı proteinin Gine domuzu polimorfonükleer lökositleri, tavuk fibroblastları, normal dalak hücreleri ve çeşitli tümör hücrelerinde sitotoksik olduğu; *E. foetida* solömik sıvısının veya lizeninin intravenöz

enjeksiyonu ile bazı sürüngenler, amfibiyanlar, kuşlar ve memelilerde ölümcül etki gösterdiği bildirilmiştir (Kobayashi vd., 2004).

Hindistan'dan toplanan *E. foetida* örneklerinin solömik sıvısında, Bradford ve Biuret metotlarıyla protein miktar tayini yapılmış ve 2,5, 5, 10, 20, 40 ile 80 µg/mL konsantrasyonlarda insan dil dokusu kökenli skuamoz hücre karsinoma (SCC-9) hücrelerinde sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile incelenmiştir (Augustine, Rao, Anbu ve Murthy, 2017). *E. foetida* solömik sıvısı konsantrasyon-bağımlı bir şekilde SCC-9 hücrelerini inhibe etmiş ve IC₅₀ değeri 44,69 µg/mL olarak bulunmuştur.

Çin'de yaşayan *E. foetida* örneklerinin solömik sıvısından elde edilen "ECFP" adlı proteinin antitümör etkisi HeLa ve LTEP-A2 hücre hatlarında 96 saat boyunca maruziyet ile MTT yöntemi kullanılarak incelenmiştir (Hua, Wang, Cao, Pu ve Cui, 2011). Çalışmada referans ilaç kullanılmamıştır. ECFP, hücre proliferasyonunu hem zamana hem de doza bağlı olarak önemli ölçüde inhibe etmiş ve IC₅₀ değerleri sırasıyla 77 µg/mL ve 126 µg/mL olarak tayin edilmiştir. ECFP'nin HeLa hücrelerindeki inhibitör etkisinin, LTEP-A2 hücre hattına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Nefroprotektif aktivite

İran'nın Şiraz şehrindeki bir stok kültüründen temin edilen *E. foetida* örnekleri, 2 saat boyunca oda sıcaklığında %0,65 NaCl solüsyonunda tutulmuş, 3 g alınarak oda sıcaklığında kloroform:metanol solüsyonunda homojenize edilmiş ve 40°C'de bir gece bekletilmiştir (Jamshidzadeh vd., 2016). Daha sonra homojenata distile su eklenmiş ve santrifüj edilmiştir. Üstteki berrak kısım alınarak, metanol evaporatörde uzaklaştırılmış ve ekstre elde edilmiştir. Ekstrenin sisplatin-nedenli böbrek hasarı oluşturulan Sprague-Dawley sıçanlardaki etkisi incelenmiştir. Deney protokolüne göre sıçanlar; kontrol grubu, sisplatin (tek doz, 7,5 mg/kg, *i.p.*), sisplatin (7,5 mg/kg, *i.p.*) + solucan ekstresi (300 mg/kg/gün, *i.p.*, 5 gün boyunca), sisplatin (7,5 mg/kg, *i.p.*) + solucan ekstresi (500 mg/kg/gün, *i.p.*, 5 gün boyunca), sisplatin (7,5 mg/kg, *i.p.*) + solucan ekstresi (300 mg/kg/gün, oral, 5 gün boyunca) ve sisplatin (7,5 mg/kg, *i.p.*) + solucan ekstresi (500 mg/kg/gün, oral, 5 gün boyunca) şeklinde 6 gruba ayrılmıştır. Sisplatin uygulamasından 4 saat sonra solucan ekstresi tatbik edilmiş ve son ekstre uygulamasından 24 saat sonra (6. gün) sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Hayvanların abdominal vena cava'larından toplanan kan

örneklerinden serum kısmı ayrılarak biyobelirteç düzeylerine bakılmış, böbrekleri de çıkarılmıştır. Sisplatin uygulanan grupta serum kreatinin ve kan üre azotu anlamlı şekilde artmışken, solucan ekstresi 300 ve 500 mg/kg/gün dozlarda böbrek dokusunda bu parametrelerin seviyelerini azaltmıştır. Ayrıca sisplatin-nedenli histopatolojik lezyonların solucan ekstresi uygulandığında düzeldiği gözlenmiştir. Bu nedenle *E. foetida* ekstresinin sisplatin-nedenli nefrotoksisitenin tedavisinde faydalı olabileceği bildirilmiştir.

Antioksidan aktivite

E. foetida'dan elde edilen G90 glikoprotein ekstresinin antioksidan etkisi insan fibroblast ve epitel hücrelerinde incelenmiş, 4 saat boyunca H₂O₂ ile muamele edilen hücre hatlarında ekstre (10 ng/mL) tamamen düzelmeye sağlamış ve proliferasyonu da hızlandırmıştır (Grdisa vd., 2001). Referans olarak kullanılan askorbik asit ise 1 mM konsantrasyonda hücre proliferasyonu üzerinde herhangi bir olumlu etki göstermemiştir. Ayrıca H₂O₂ (1 mM) ile toksisite oluşturulmadan 48 önce G90 ekstresi ile inkübe edilen hücre hatlarında oksidatif hasar oluşmamıştır. Ekstrenin oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin, askorbik asitten çok daha güçlü olduğu bildirilmiştir.

Pakistan'ın Muzaffarabad, Azad Jammu ve Keşmir bölgelerinden toplanan *E. foetida* örnekleri kurutularak elde edilen toz dietileter, kloroform, metanol ve EtOH ile hazırlanan ekstreleri ilecanlı solucandan 3 gün sonra toplanan "mukus-I", 6 gün sonra toplanan "mukus-II", 9 gün sonra toplanan "mukus-III" ve 12 gün sonra toplanan "mukus-IV" olarak adlandırılan ve homojenize edilen solömik sıvılarının; 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikal süpürücü aktivitesi tayin edilmiştir (Andleeb vd., 2016). En yüksek ABTS süpürücü aktiviteyi mukus-IV (%99) göstermiş, onu mukus-III (%96), mukus-II (74), mukus-I (%72), EtOH ekstresi (%70), metanol ekstresi (%39), kloroform ekstresi (%30) ve dietileter ekstresi (%12) takip etmiştir.

Miyokonstraktör aktivite

E. foetida'da bulunan lizeninin düz kas kontraksiyonu üzerine etkisi araştırılmış ve sıçan aort düz kaslarında uzun süreli kontraksiyona neden olduğu gözlenmiştir (Sekizewa vd., 1996; Sekizewa, Kubo, Kobayashi, Nakajima ve Natori, 1997). Düz kas kontraksiyonu 10⁻⁷ M konsantrasyonda lizenin ile 15. dk'da maksimuma çıkmış ve toplam 40 dk sürmüştür.

Lizeninin ATPaz'ı inhibe ettiği ve tropomyozin kasının etkisi ile çok düşük konsantrasyonda düz kasta kontraksiyona neden olduğu tespit edilmiştir (Czurylo vd., 2008). *E. coli*'de üretilen rekombinant lizenin ile doğal lizenin, sıçan aortasında benzer düzeyde kontraksiyona sebep olmuştur (Sekizewa, Kubo, Kobayashi, Nakajima ve Natori, 1997).

Diğer biyolojik aktiviteleri

E. foetida'nın solömik sıvısından elde edilen lizenin spesifik olarak çeşitli fosfolipitler arasında, memeli spermatozoalarının plazma zarlarında mevcut olduğu bilinen sfingomiyeline bağlanmaktadır. Sfingomiyelinin plazma membranları üzerindeki işlevini araştırmak için, lizeninin kurbağa (*Xenopus laevis*) ve fare (*Mus musculus*) spermatozoası üzerindeki etkileri incelenmiştir (Ito, Abe, Sekizawa ve Kobayashi, 1997). Lizeninin hem kurbağa hem de fare spermlerinin hareketliliğini engellediği ve birkaç dk içinde de öldürdüğü tespit edilmiştir. Sfingomiyelin yüklü-lipozomlar ile inkübe edilmiş olan lizeninin kurbağa ve fare spermatozoaları üzerindeki öldürücü etkisinin çok düşük olduğu bulunmuştur. Fare spermatozoaları lizenin ile tedavi edildikten sonra, tüm uzunlukları boyunca floresanla etiketlenmiş lizenin-spesifik antikoruyla immünoreaksiyona girmişlerdir. Bu bulgular, lizeninin spermatozoa üzerindeki öldürücü etkilerinin, plazma zarının işlevlerinin bozulmasından kaynaklandığını düşündürmüştür. Bir başka çalışmada da lizeninin çeşitli hücrelerin plazma membranında bulunan sfingomiyelinlere spesifik olarak bağlandığı gösterilmiştir (Shakor vd., 2003). Lizeninin 5 ng/mL konsantrasyonda koyun eritrositlerinin %50'sini hemoliz ettiği, aynı düzeydeki hemoliz etkisinin insan ve sıçan eritrositlerinde 20 kat daha yüksek konsantrasyonda lizeninle görüldüğü saptanmıştır (Yamaji vd., 1998). Lizeninin omurgalı ve omurgasız canlılarda spermatozoalarına da toksik etkili olduğu bulunmuştur (Kobayashi vd., 2000).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Tez çalışmamızda kullanılan *E. foetida* adlı solucan örnekleri ile katı ve sıvı formdaki gübreleri Rize Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi solucan üretim çiftliğinden temin edilmiş ve tez gereçlerimizi teşkil etmiştir. Tezimizde kullanılan sıvı ve katı solucan gübrelerinin elde edilme yöntemi aşağıdaki şekildedir.

Sıvı solucan gübresi elde etmek için hammadde olarak Doğu Anadolu bölgesindeki doğal meralarda otlayan hayvanlardan elde edilen ve fermente olmuş tezek kullanılmıştır. Bu tezek daha sonra öğütme değirmeninde öğütülerek granül hale getirilmiştir. Granül haldeki tezek su ile yoğrularak besi maması haline getirilmiş, besi ortamına aktarılmış ve besi ortamına Lazutim Ltd. Şti.'den sağlanan *E. foetida* bireyleri yerleştirilmiştir. Oda koşullarında 60 gün süreyle besi ortamındaki nem %45-60 arasında olacak şekilde izlenmiş, nem değeri azaldıkça besi ortamına hafif püskürtme yöntemiyle su ilave edilmiştir. Solucan besleme ortamındaki işlem sırasında besi ortamından yıkanan sıvı solucan ekstresi besleme kabı çıkışına yerleştirilen kaplarda toplanmıştır. Kaplarda toplanan sıvı solucan gübresi en az 2 kez ince tülbentden süzülerek saklama kaplarına aktarılmış ve serin odada muhafaza edilmiştir. Katı ve sıvı solucan gübresinin elde edilmesinde uygulanan besleme düzeneği Resim 3.1.'de verilmektedir.



Resim 3.1. Katı ve sıvı solucan gübresi üretiminde kullanılan besleme düzeneği

Katı solucan gübresi elde etmek için granül haldeki tezek solucan besleme kaplarına yerleştirilmiştir. Solucan besleme yatağındaki tüm yemler oda sıcaklığında 60 gün içinde solucanlar tarafından sindirilmiş, solucanlar başka bir yatağa göç ettirilmiş ve katı solucan gübresi besleme yatağından hasat edilmiştir. Daha sonra katı solucan gübresi besleme yatağından alınmış ve havadar bir alanda yaklaşık 1 hafta boyunca “hafa kurusu” (nem seviyesi %30 seviyesine gelinceye kadar kurutulmuş) haline getirilmiş ve daha sonra ambalajlanmıştır. Katı solucan gübresinin elde edilmesine ait görsel Resim 3.2.’de verilmektedir:



Resim 3.2. Tezekten elde edilen katı solucan gübresi elde edilme aşamaları

3.2. Yöntemler

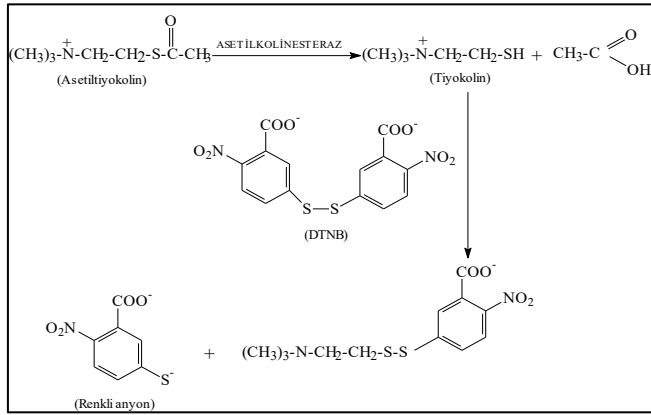
3.2.1. Ekstrelerin hazırlanması

Öncelikle tez gereçlerimizi oluşturankatı gübre, liyofilize edilen sıvı gübre ve cansız formdaki solucanlar tartılmış; katı gübre ve solucanlar diklorometan (DKM), etilasetat (EtOAc) ve EtOH’de (%80) oda sıcaklığında 2 gün süreyle ara sıra çalkalamak suretiyle maserasyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda filtre kâğıdından süzülen organik çözücü kısımları, alçak basınç altında 45°C’lik su banyosu kullanılarak evaporatörde (Büchi, İsviçre) kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır. Elde edilen ekstreler tartılarak verimleri (a/a) hesaplanmış ve daha sonraki deneysel aşamalarda kullanılmak üzere +4°C’de muhafaza edilmiştir. Örneklere ait %ekstre verimleri Çizelge 4.1., 4.2. ve 4.3.’te verilmektedir.

3.2.2. Enzim inhibisyon testleri

AChE enzim inhibisyonu

Solucan ekstralarının AChE inhibitör aktivitesi Ellman vd. (1961) tarafından bulunan, modifiye edilmiş spektrofotometrik Ellman yöntemi kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 3.1.). Enzim kaynağı olarak elektrikli yılan balığı AChE'ı (Sigma, EC 3.1.1.7) kullanılırken, substrat olarak asetiltiyokoliniyodür (Sigma, ABD), 5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik)asit (DTNB, Sigma, ABD) ise renklendirici madde olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Ellman yönteminin reaksiyon mekanizması

Deney protokolüne göre; 96 kuyucuklu mikrolaktaki tüm kuyucuklara ilk önce 140 µL 0,1 M fosfat tamponu çok kanallı mikropipet (Eppendorf) ile konulmuştur. Daha sonra 96 kuyucuklu mikrolağın ilk 3 ve son 9 kuyucuğu kontrol olarak ayrılmıştır. Bu ayrılan kuyucuklara kontrol olarak kullanılan 20 µL EtOH yine mikropipet yardımıyla eklenmiştir. Hazırlanmış olan örneklerden 20'şer µL, her örnek 3 paralel olacak şekilde geriye kalan kuyucuklara ilave edilmiştir. AChE enzim çözeltisinden bütün kuyucuklara eklendikten sonra mikrolaklar 10 dk 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda mikrolaktaki tüm kuyucuklara 10 µL DTNB (Sigma, ABD) çözeltisi, hemen arkasından 10 µL 0,4 mM substrat (asetiltiyokoliniyodür, Sigma, ABD) çözeltisinden eklenmiştir. Mikrolaklar 412 nm dalga boyunda 96 kuyucuklu ELISA mikrolak okuyucuda (Versamax tunable microplate reader, ABD) okutulmuştur. Örneklerin %AChE inhibisyonları aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen %inhibisyonların ortalaması ± standart sapma (S.S.) olarak verilmiştir. Referans ilaç olarak galantamin, negatif kontrol olarak ise EtOH kullanılmıştır.

$$\% \text{İnhibisyon} = 100 - [(A_1 / A_2) \times 100]$$

A_1 = Örnek çözeltilerinin 412 nm dalga boyundaki absorbansı

A_2 = Kontrol çözeltilerinin 412 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

Sonuçlar Softmax PRO 4.3.2.LS bilgisayar programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

BChE enzim inhibisyonu

Solucan ekstrelerinin BChE inhibitör aktivitesinin ölçümünde; AChE enzim inhibisyonu ölçümünde (3.2.2) verilen yöntem uygulanmıştır (Ellman vd., 1961). Enzim kaynağı olarak at serum bütirikolinesterazı (Sigma, EC 3.1.1.8) kullanılırken, substrat olarak bütiriltiyokolinklorür (Sigma, ABD), renklendirici madde olarak ise DTNB (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Deney yöntemi AChE enzim inhibisyonu yöntemi ile aynı olup, tek fark bu yöntemde enzim olarak BChE, substrat olarak ise bütiriltiyokolinklorür kullanılmış olmasıdır. Örneklerin %BChE inhibisyonları yukarıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen % inhibisyonların ortalaması \pm S.S. şeklinde verilmiştir. Referans ilaç olarak galantamin, negatif kontrol olarak ise EtOH kullanılmıştır.

TYR enzim inhibisyonu

Solucan ekstrelerinin TYR inhibitör potansiyeli Masamoto vd. (2003) tarafından geliştirilen, Lee vd. (2009) tarafından modifiye edilen spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. Levadopa/3,4-dihidroksi-L-fenilalaninin (L-DOPA, Sigma, ABD) substrat olarak kullanıldığı yöntemin esası, substratın enzim ile reaksiyonu sonucu oluşan dopakromun absorbansının 492 nm'de ölçülmesine dayanmaktadır. Öncelikle 96 kuyucuklu mikroplağın ilk 3 ve son 9 kuyucuğu kontrol olarak ayrılmış, örnek çözeltisi (10 μ L) veya negatif kontrol olarak dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiştir. Ardından 80 μ L fosfat tamponu (pH 6,8) ve 30 μ L 5 mM L-DOPA ilave edilmiştir. Mikroplaklar 37°C'de 10 dk inkübe edilmiş ve ardından 30 μ L mantar kaynaklı TYR (EC 1.14.18.1, Sigma) enzim solüsyonu kuyucuklara eklenmiştir. Akabinde 20 dk daha inkübasyonun ardından, absorbans 492 nm'de ELISA mikroplak okuyucuda (Versamax tunable microplate reader,

ABD) ölçülmüştür. α -Kojik asit (Sigma, ABD) referans olarak kullanılmıştır. Örneklerin %TYR inhibisyonları aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen %inhibisyonların ortalaması \pm S.S. olarak verilmiştir.

$$\% \text{İnhibisyon} = 100 - [(A_1 / A_2) \times 100]$$

A_1 = Örnek çözeltilerinin 492 nm dalga boyundaki absorbansı

A_2 = Kontrol çözeltilerinin 492 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

Elastaz enzim inhibisyonu

Elastaz inhibisyonu testi; Kraunsoe, Claridge ve Lowe'un (1996), spektrofotometrik yönteminin, Lee vd. (2009) tarafından modifiye edilmiş şekliyle uygulanmıştır. Enzim kaynağı olarak domuz pankreatik elastazı (Tip IV, Sigma, EC 3.4.21.36) kullanılırken, substrat olarak *N*-Suc-(Ala)³-*p*-nitroanilit (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Yöntemin esası, substrattan salınan nitroanilin 410 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanmaktadır. Öncelikle 96 kuyucuklu mikroplağın ilk 3 ve son 9 kuyucuğu kontrol olarak ayrılmıştır. Substrat 0,1 M Tris-Cl (pH 8,0) tamponunda hazırlanmış ve bu çözelti 96 kuyucuklu mikroplakta DMSO'da çözülen örneklerin üzerine eklenmiştir. Mikroplak 25°C'de 5 dk ön-inkübasyona bırakıldıktan sonra her bir kuyucuğa 0,5 ünite/mL enzim solüsyonu eklenmiştir. Enzim eklendikten sonra mikroplak 25°C'de 30 dk inkübe edilmiş ve substrattan salınan *p*-nitroanilin miktarı 410 nm'de ELISA mikroplak okuyucuda (Versamax tunable microplate reader, ABD) okutulmuştur. Referans olarak oleanolik asit (Sigma, ABD), negatif kontrol olarak ise DMSO kullanılmıştır. Örneklerin %elastaz inhibisyonları aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen %inhibisyonların ortalaması \pm S.S. olarak verilmiştir.

$$\% \text{İnhibisyon} = 100 - [(A_1 / A_2) \times 100]$$

A_1 = Örnek çözeltilerinin 410 nm dalga boyundaki absorbansı

A_2 = Kontrol çözeltilerinin 410 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

Kolajenaz enzim inhibisyonu

Kolajenaz enzim inhibisyonu Wart ve Steinbrink'in (1981) geliştirdiği, Barrantes ve Guinea (2003) tarafından modifiye edilmiş spektrofotometrik yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. Enzim kaynağı olarak *Clostridium histolyticum* kolajenazı (Sigma, EC 3.4.24.3) kullanılırken, substrat olarak *N*-(3-[2-furil]akriloil)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Öncelikle 96 kuyucuklu mikroplağın ilk 3 ve son 9 kuyucuğu kontrol olarak ayrılmıştır. Enzim (0,8 ünite/mL) ve substrat trisin tamponunda (10 mM CaCl₂ ve 400 mM NaCl ile pH 7,5) çözülmüştür. Akabinde 25 µL tampon, DMSO, enzim ve örnekler 96 kuyucuklu mikropklara eklenmiş ve 15 dk ön-inkübasyondan sonra 50 µL substrat eklenmiştir. Absorbans 340 nm'de 20 dk boyunca 2'şer dk aralıklarla ELISA mikropklak okuyucuda (Versamax tunable microplate reader, ABD) okunmuştur. Referans olarak (-)-epigallokateşin gallat (EGCG, Sigma, ABD), negatif kontrol olarak ise DMSO kullanılmıştır. Örneklerin %kolajenaz inhibisyonları aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen %inhibisyonların ortalaması ± S.S. olarak verilmiştir.

$$\% \text{İnhibisyon} = 100 - [(A_1 / A_2) \times 100]$$

A_1 = Örnek çözeltilerinin 340 nm dalga boyundaki absorbansı

A_2 = Kontrol çözeltilerinin 340 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

KO enzim inhibisyonu

KO inhibisyonu yöntemi, enzim reaksiyonu sonucunda oluşan ürik asitin absorbansının 295 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Khan vd., 2006). Yönteme göre; öncelikle 96 kuyucuklu mikroplağın ilk 3 ve son 9 kuyucuğu kontrol olarak ayrılmıştır. 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,5), 10 µL DMSO, örnekler ve enzim (0,003

ünite/kuyucuk, EC 1.17.3.2.) 96 kuyucuklu mikropalakların her bir kuyucuğuna eklenmiştir. 10 dk ön-inkübasyondan sonra substrat olarak 20 µL ksantin (0,1 mM) eklenerek reaksiyon başlatılmış ve absorbans değişimi 10 dk boyunca ELISA mikropalak okuyucuda (Versamax tunable microplate reader, ABD) 295 nm’de ölçülmüştür. Referans ilaç olarak allopurinol, negatif kontrol olarak ise DMSO kullanılmıştır. Örneklerin %KO inhibisyonları aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen %inhibisyonların ortalaması ± S.S. olarak verilmiştir.

$$\% \text{İnhibisyon} = 100 - [(A_1 / A_2) \times 100]$$

A₁= Örnek çözeltilerinin 295 nm dalga boyundaki absorbansı

A₂= Kontrol çözeltilerinin 295 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

3.2.3. Hücre kültürü deneyleri

E. foetida solucan EtOH ekstresinin ve liyofilize sıvı gübresinin dental pulpa mezenkimal kök hücreleri (DP-MKH) gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Solucan EtOH ekstresi ile liyofilize sıvı gübresi DMF10 [DMEM-LG, %10 fetal bovine serum (FBS), %1 Pen/Strep] içerisinde hazırlanmıştır. 8000 hücre/kuyu olacak şekilde dental pulpa mezenkimal kök hücreleri (DP-MKH) 96 kuyucuklu mikropalalara eklenmiş ve hücre tutunmasını takiben farklı konsantrasyonlardaki ekstreler eklenmiş, 24 ve 48 saat boyunca kültüre edilmiştir. Süre sonunda hücre canlılığı kolorimetrik olarak 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfenil)-2H-tetrazolyum hücre proliferasyon test kiti (WST-1, Abcam) ile üretici firmanın yönergeleri takip edilerek belirlenmiştir.

E. foetida solucan EtOH ekstresinin DP-MKH kemikleşme özelliklerinin üzerine etkisinin belirlenmesi

DP-MKH gelişimi sonuçlarına göre seçilen 20 µg/mL solucan EtOH ekstresi içeren kemikleşme vasadı ile DP-MKH kemikleşmesi 21 gün süre ile araştırılmıştır. Çalışmada Pittenger vd.’nin (1999) yöntemi kullanılmıştır. Kısaca, gelişme kültür vasadında %70-80 yayılım gösteren hücrelerden vasat uzaklaştırılmıştır. Fosfat tampon solüsyonu (phosphate

buffer solution, PBS, Sigma) ile yıkanan hücreler osteojenik farklılaşma vasadı ile muamele edilmiştir. Farklılaşma vasadı, “Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose” (DMEM-LG) vasatı içerisinde %10 FBS, 10 mM gliserofosfat, 0,2 mM askorbik asit, 100 nM deksametazon ve %1 Pen/Strep'den oluşmuştur. 21 günlük süre boyunca, her 3-4 günde bir kültür vasadı değiştirilmiştir. Her kültür vasadı değiştirildiğinde ekstrenin eklendiği grup (OST-CONT) ile farklılaşmanın 4 ve 14. günlerine denk gelen vasat değişimlerinde ekstre eklenen grup (OST-4,14) ve ekstre eklenmeyen grup olmak üzere (OST); 3 farklı deney grubu oluşturulmuştur. Alizarin kırmızısı ile boyamalar 21. günde gerçekleştirilmiştir. Kalsiyum miktarı DICA 500 ile erken farklılaşma işareti osteonektin (ON), geç kemikleşme işareti osteokalsin (OCN) ise ELISA yöntemi ile belirlenmiştir.

Ekstraselüler matris (ESM) komponentlerine *E. foetida* solucan EtOH ekstresinin etkisinin belirlenmesi

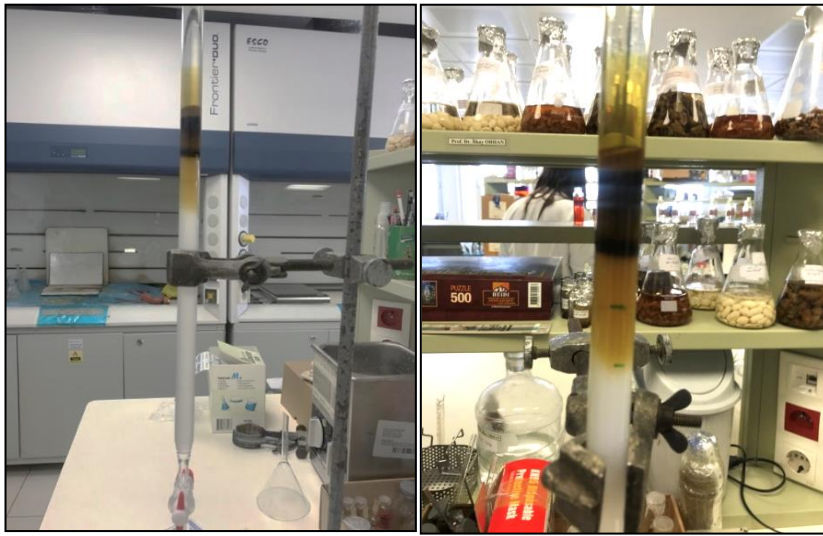
12 kuyucuklu mikropakta kemikleşme yönünde uyarılan DP-MKH hücrelerinde hücre kolajen miktarının belirlenmesi analizleri için ESM Sircol kolajen kiti kullanılmıştır. Kısaca, 48 saat 48°C'de 0,1 mg/mL pepsin içeren 0,5 M asetik asitte inkübe edilmiştir. Örnek Sircol boya ajanına eklenmiş, kolajen boya kompleksleri oluşturmuş ve bağlanmamış boyadan çökelti (presipitat) olarak ayrılmıştır. Santrifüj işleminden sonra pellet bir kez asit-tuz yıkama ajanı ile yıkanmış ve alkali ajan ile süspand edilmiştir. 200 µL çözelti 96 kuyucuklu mikroplağa aktarılarak, absorbans 555 nm'de ölçülmüştür. Kolajen miktarı standarda göre belirlenmiştir. Kemikleşme prosesinde 21 gün süresince; her kültür vasadı değiştirildiğinde ekstrenin eklendiği grup (OST-CONT) ve farklılaşmanın 4 ve 14. günlerine denk gelen vasat değişimlerinde ekstre eklenen grup (OST-4,14) ve ekstre eklenmeyen grup olmak üzere (OST) 3 farklı deney grubu oluşturulmuştur.

3.2.4. Kimyasal analizler

Kolon kromatografisi

Ön taramamızda uygulanan enzim inhibisyon testlerinde en yüksek inhibitör aktiviteye sahip ekstrelerden biri olduğu belirlenen *E. foetida*'nın katı gübresinden hareketle hazırlanan EtOH ekstresi, tezdeki fitokimyasal çalışmalarımız için seçilmiş ve kolon kromatografisi (KK) ile fraksiyonlama işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla KK'nde adsorban

olarak silika jel kullanılmıştır. Kolon hazırlamak için 150 g tartılan silika jel DKM'da süspande edilerek cam kolona doldurulmuştur. *E. foetida* ekstresinden 1,183 g tartılmış ve EtOH'de çözülerek kolona tatbik edilmiştir (Resim3.3.). Elüsyon, gradient sistem uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Kolona tatbik edilen *E. foetida*'nın katı gübresinden hareketle hazırlanan EtOH ekstresi; sırasıyla DKM (%100), DKM:EtOAc (50:50), EtOAc (%100), aseton (%100), aseton:metanol (50:50) ile elüe edilmiş, KK sonucu elde edilen fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi (İTK) ile değerlendirilmiş, benzer bileşikleri içeren fraksiyonlar birleştirilmiş ve toplam 9 fraksiyon elde edilmiştir.



Resim 3.3. *E. foetida* katı gübre EtOH ekstresine ait KK

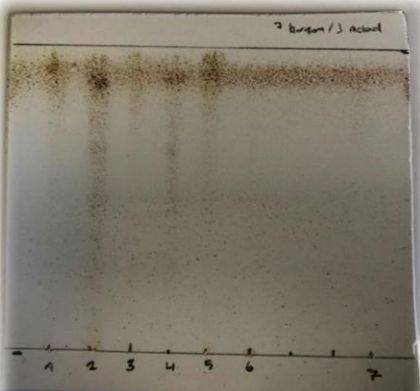
Diğer KK de *E. foetida* bireylerinden elde edilen DKM solucan ekstresi için kurulmuştur. Bu kolonu hazırlamak için; silika jel (150 g) DKM'da süspande edilerek cam kolona doldurulmuştur. DKM ekstresinden 1,372 g tartılmış ve DKM'da çözülerek kolona tatbik edilmiştir (Resim 3.4.). Elüsyon, gradient sistem uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Kolona tatbik edilen DKM ekstresi üzerinden sırasıyla DKM (%100), DKM:EtOAc (50:50), EtOAc(%100), aseton (%100), aseton:metanol (35:15) ile elüe edilmiş, KK sonucu elde edilen fraksiyonlar İTK ile değerlendirilmiş, benzer bileşikleri içeren fraksiyonlar birleştirilmiş ve toplam 7 fraksiyon elde edilmiştir.



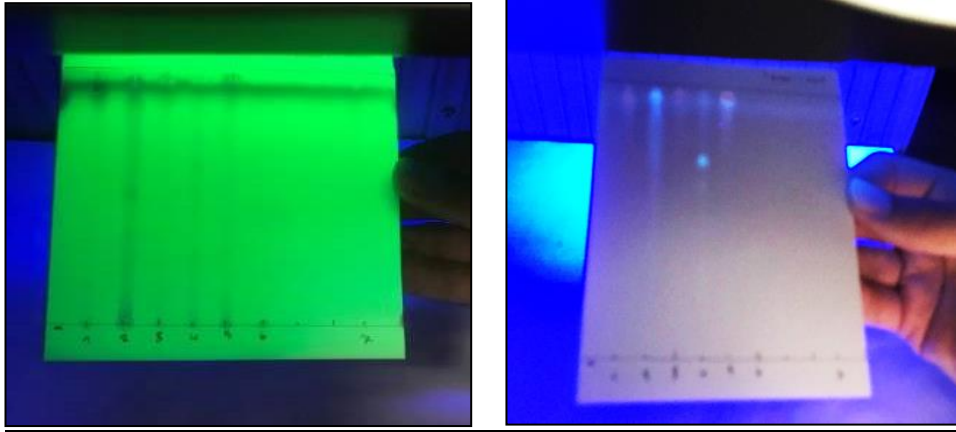
Resim 3.4. *E. foetida* solucan DKM ekstresine ait KK

İnce tabaka kromatografisi (İTK)

KK sonucu elde edilen fraksiyonların takip edilmesinde, normal faz silika jel kaplı aluminyum plaklar (Merck, Silica gel 60 F₂₅₄) kullanılarak İTK yöntemi uygulanmıştır. Hareketli faz olarak DKM:metanol (70:30), revelatör olarak ise vanilin/sülfürik asit kullanılmıştır. Plaklar hareketli fazda sürüklendikten sonra kurutulmuş, UV 254 ve 366 nm’de incelenmiş, reaktif püskürtüldükten sonra 110°C’de yaklaşık 10 dk ısıtılarak lekeler belirlenmiştir. İTK’deki sıra şu şekildedir; 1: Katı gübre DKM, 2: Solucan DKM, 3: Katı gübre EtOAc, 4: Solucan EtOAc, 5: Katı gübre EtOH, 6: Liyofilize sıvı gübre (EtOH’de), 7: Liyofilize sıvı gübre (distile suda) (Resim 3.5. ve 3.6.)



Resim 3.5. *E. foetida*’dan hazırlanan ekstrelerin İTK profili



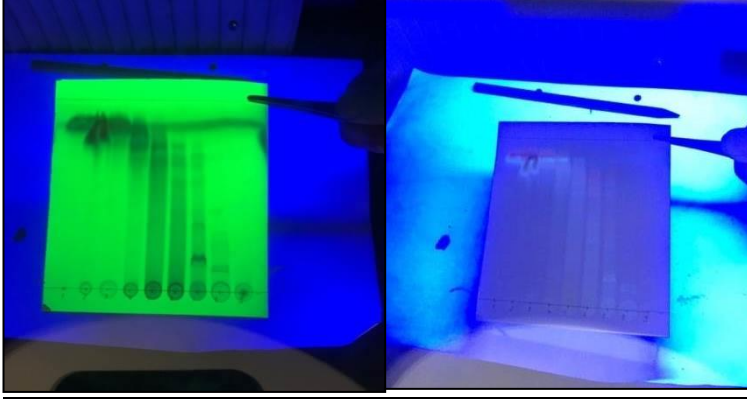
Resim 3.6. UV 254 nm'de (solda) ve 366 nm'de (sağda) ekstrelerin İTK profili

Ekstreler hareketli faz olarak farklı bir solvan sistemi olan DKM:metanolde (80:20) sürüklendikten sonra kurutulmuş, UV 254 ve 366 nm'de incelenmiş, reaktif püskürtüldükten sonra 110°C'de yaklaşık 10 dk ısıtılarak lekeler belirlenmiştir (Resim 3.7.).

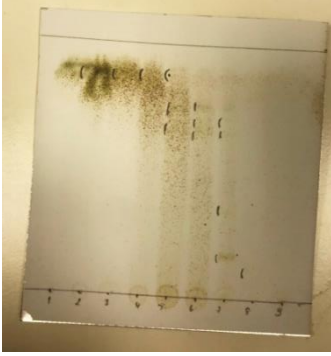


Resim 3.7. UV 254 nm'de (solda) ve 366 nm'de (sağda) ekstrelerin İTK profili

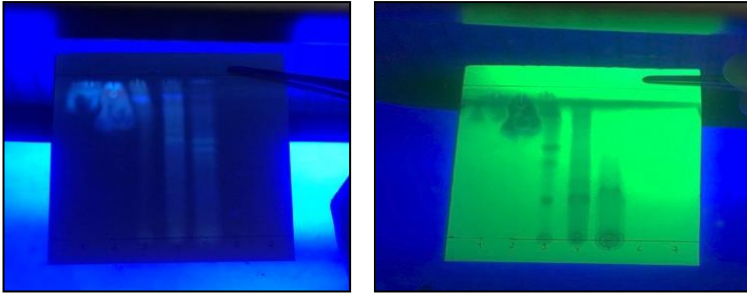
E. foetida katı gübre EtOH ekstresi ile solucan DKM ekstresinin KK sonucu elde edilen fraksiyonların takip edilmesinde, normal faz silika jel kaplı alüminyum İTK plakaları (Merck, Silica gel 60 F₂₅₄) kullanılmıştır. Hareketli faz olarak DKM:MeOH (80:20), revelatör olarak ise vanilin/sülfürik asit kullanılmıştır. Plaklar sürüklendikten sonra kurutulmuş, UV 254 ve 366 nm'de incelenmiş, reaktif püskürtüldükten sonra 110°C'de yaklaşık 10 dk ısıtılarak lekeler belirlenmiştir (Resim 3.8.-3.10.).



Resim 3.8. *E. foetida* katı gübresi EtOH ekstresine ait alt fraksiyonlarının 254 nm (solda) ve 366 nm'de (sağda) İTK profili



Resim 3.9. *E. foetida* katı gübre EtOH ekstresinin KK fraksiyonlarının İTK profili



Resim 3.10. *E. foetida* DKM ekstresine ait alt fraksiyonların 254 nm (solda) ve 366 nm'de (sağda) İTK profili

LC-Q-ToF-MS analizleri

E. foetida ekstralarının kimyasal profilini belirlemek üzere LC-Q-ToF-MS analizleri yapılmıştır. Analizler Agilent 1260 serisi HPLC sistemi ve bu sistem ile kombine Agilent 6550 iFunnel Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi (Agilent Technologies, Inc., CA, USA) cihazında yapılmıştır. Elde edilen veriler Agilent MassHunter yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Analizlerde MS sistemi çift spreylili Agilent jet stream elektrosprey iyonlaşma tekniği ile kullanılmış ve analizler pozitif modda yapılmıştır. MS çalışma modu 2 GHz'dir (Extended Dynamic Range). Kromatografik ayırım için TC-C18 (4,6 mm ×150 mm × 5 µm) kolon kullanılmıştır. Analiz ve veri değerlendirmelerde Agilent MassHunter Yazılım B06.00 ve Metlin Metabolit veritabanı kullanılmıştır. Analizde uygulanan kromatografik şartlar Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. LC-Q-ToF-MS analizinde uygulanan kromatografik şartlar

Kolon	Agilent TC-C18 (4,6 mm ×150 mm × 5 µm)
Kolon fırını sıcaklığı	40°C
Enjeksiyon hacmi	1 µL
Analiz süresi	35 dk
Mobil faz A	%0,1 formik asit (h/h)
Mobil faz B	Asetonitril
Akış hızı	0,6 mL/dk
Akış programı	Çizelge 3.2.'de verilmektedir.
İyonizasyon modu	Pozitif
Kurutucu gaz sıcaklığı	180°C
Kurutucu gaz akış, N₂	14 L/dk
Nebulizör basıncı	40 psi
Nebulizör yardımcı gaz akışı	12 L/dk
Nebulizör yardımcı voltajı	500 V
Kapiler voltajı	2000 V
Parçalama voltajı	2000 V
Çarpışma (collision) enerjisi	20 eV (değişken mod)
Kütle okuma aralığı	50-3000 amu
Referans iyonlar	922,0098

Çizelge 3.2. LC-MS-MS analizinde kullanılan gradient solvan sistemi

Zaman (dk)	Faz A (%)	Faz B (%)
0	95	5
2	95	5
10	80	20
18	30	70
20	10	90
24	10	90
24,1	5	95
35	5	95

Kütle analizleri örneklerin metanol içindeki çözeltileri kullanılarak yapılmıştır. Ekstrenin ve aktif fraksiyonların parçalanma ürünlerinin belirlenmesi, LC- Q-ToF-MS ile cihazın “Auto MS-MS” modunda gerçekleştirilmiştir. KS eşleşmeleri ile bulunan kapalı formüller kütüphanede (Metlin Metabolite) taranarak eşleşen bileşikler tespit edilmiştir.

3.2.5. Moleküler kenetlenme çalışmaları

E. foetida solucan EtOH ekstresinde teşhis edilen ektoin ve hipoksantin adlı moleküller üzerinde BChE’ya karşı moleküler kenetlenme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, Schrödinger Small-Molecule Drug Discovery Suite 2021-4 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021) kullanılmıştır. İnsan BChE (PDB kodu: 4TPK) yapısı RCSB Protein Data Bank veri tabanından indirilmiş (Brus vd., 2014), Schrödinger programının “Protein Preparation Wizard” modülü kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlık aşamasında aktif bölgedeki kristal su molekülleri silinmiş, hidrojen atomları eklenmiş, eksik veya yanlış atom tipleri düzeltilmiştir. Sıvı solüsyonlar için optimize potansiyel (optimized potential for liquid simulations, OPLS4) kuvvet alanı uygulanarak, kök ortalama kare sapma (root-mean-square deviation, RMSD) değeri en fazla 0,3 Å olacak şekilde enerji minimizasyonu yapılmıştır. Enzim X-ışını kristal yapısına bağlı inhibitör molekül seçilerek, inhibitörün çevresinde aktif bölgeyi koordinatlarıyla tanımlayan 20 Å’luk bir kutu (grid), “receptor grid generation” paneli ile oluşturulmuştur. Bu aşamada kuvvet alanı olarak yine OPLS4 kullanılmış, Van der Waals ölçeklendirme faktörü 0,80 ve yük parçalı kesme noktası 0,15 olarak tanımlanmıştır. Elde edilen reseptör grid dosyaları moleküler kenetlenme çalışmasında kullanılmak üzere kaydedilmiştir. Moleküler kenetlenme çalışması için seçilen bileşikler, Schrödinger programının Maestro ara yüzünde çizilmiş ve LigPrep (Schrödinger Release 2021-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021) modülü ile varsayılan değerler kullanılarak üç boyutlu yapıları hazırlanmıştır. Moleküller önceden kaydedilen grid dosyası üzerinden Schrödinger programının Glide modülü ile enzim aktif bölgesine Extra Precision (XP) algoritması kullanılarak yerleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar GlideScore değerleri temel alınarak incelenip, moleküllere ait uygun bağlantı modları belirlenmiştir (Friesner vd., 2006).

4. BULGULAR

4.1. Ekstrelerin Verimine Ait Bulgular

Tez çalışmamızda hazırlanan *E. foetida* ekstrelerine ait %verimler (a/a) Çizelge 4.1.'de verilmektedir.

Çizelge 4.1. *E. foetida* ekstrelerine ait % verimler

No.	Ekstre adı	%Verim (a/a)
1	<i>E. foetida</i> katı gübre EtOH ekstresi	0,19
2	<i>E. foetida</i> katı gübre EtOAc ekstresi	0,74
3	<i>E. foetida</i> katı gübre DKM ekstresi	0,46
4	<i>E. foetida</i> solucan EtOH ekstresi	14,7
5	<i>E. foetida</i> solucan EtOAc ekstresi	3,48
6	<i>E. foetida</i> solucan DKM ekstresi	0,63
7	<i>E. foetida</i> liyofilize sıvı gübre	0,88

E. foetida katı gübre EtOH ekstresine ait fraksiyonların verimine ait bulgular

Fraksiyonlama işleminde kullanılan *E. foetida* katı gübre EtOH ekstresi %0,185 (a/a) verimle elde edilmiştir. Bu ekstreye uygulanan KK ile elde edilen 9 fraksiyon EF-EtOH-1 ve EF-EtOH-9 arasında kodlanmıştır.

E. foetida solucan DKM ekstresine ait fraksiyonların verimine ait bulgular

Fraksiyonlama işleminde kullanılan *E. foetida* solucan DKM ekstresi %0,63 (a/a) verimle elde edilmiştir. Bu ekstrede hareketle KK ile elde edilen 7 fraksiyon EF-DKM-1 ve EF-DKM-7 arasında kodlanmıştır.

4.2. Ekstrelerin ve Fraksiyonların Enzim İnhibisyonlarına Dair Bulgular

Katı gübre ile hazırlanan EtOH ekstresi ve liyofilize edilmiş sıvı gübre ekstresi ile 3 farklı konsantrasyonda (1000, 2000 ve 4000 µg/mL) 6 adet enzime (AChE, BChE, KO, TYR, elastaz ve kolajenaz) karşı inhibitör etkileri ELISA mikropłaka okuyucu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstreler elastaz, kolajenaz, KO ve AChE'a karşı etkisiz bulunurken; TYR inhibisyonunun da %5'in altında olduğu tespit edilmiştir. BChE'a karşı ise katı gübre

EtOH ekstresinin konsantrasyon-bağımlı olarak 4000 $\mu\text{g/mL}$ 'de $49,41 \pm 3,27$ inhibisyona neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. *E. foetida* katı gübre EtOH ekstresinin enzim inhibitör etkisi

Ekstreler	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	BChE İnhibisyonu (%İnhibisyon \pm S.S. ^a)
Katı gübre EtOH ekstresi	1000 ^b	19,46 \pm 2,15
	2000 ^b	35,54 \pm 2,88
	4000 ^b	49,41 \pm 3,27
Sıvı liyofilize ekstre	1000	- ^c
	2000	-
	4000	-
Galantamin (Referans, 1000 $\mu\text{g/mL}$)		60,30 \pm 1,36 (IC ₅₀ = 52,31 \pm 3,04 $\mu\text{g/mL}$)

^aStandart sapma (n: 3), ^bStok konsantrasyon, ^cİnhibisyon gözlenmedi

Ayrıca doğrudan solucandan ve katı gübrelerinden hareketle EtOH (BChE hariç), EtOAc ve DKM ile hazırlanan ekstrelerin; kolinesterazlar, elastaz, kolajenaz, TYR ve KO inhibitör etkileri 2000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3.'te verilmektedir.

Çizelge 4.3. *E. foetida* solucan ve katı gübre ekstrelerinin kolajenaz, KO, elastaz, AChE, BChE ve TYR inhibitör etkisi

%İnhibisyon \pm S.S. ^a (2000 $\mu\text{g/mL}$ ^b)					
Kolajenaz	Elastaz	KO	AChE	BChE	TYR
18,03 \pm 5,97 (Solucan DKM)	- ^c	-	-	12,82 \pm 2,99 (Katı gübre DKM)	-
77,72 \pm 6,17 (Liyofilize sıvı gübre)	-	-	-	19,12 \pm 2,09 (Solucan EtOAc)	-
81,92 \pm 3,79 (Katı gübre EtOH)	-	-	-	39,33 \pm 1,26 (SolucanDKM)	-
Referanslar (1000 $\mu\text{g/mL}$ ^b)					
1,10-Fenantrolin	MSACK ^d	Allopurinol	Galantamin	Galantamin	α -Kojik asit
74,94 \pm 3,98	99,65 \pm 0,08	98,60 \pm 0,89	97,11 \pm 1,26	60,30 \pm 1,36	88,77 \pm 0,31

^aStandart sapma (n: 3), ^bStok konsantrasyon, ^cİnhibisyon gözlenmedi, ^dN-(metoksisüksinil)-Ala-Ala-Pro-Val-klorometil keton

Enzim inhibisyon testlerinde elde edilen sonuçlara göre; liyofilize sıvı ekstre ve katı gübre EtOH ekstresi, kolajenaza karşı sırasıyla %77,72 ± 6,17 ve %81,92 ± 3,79 oranında olmak üzere güçlü inhibisyon göstermiştir. Test edilen ekstreler BChE'a karşı %50'nin altında inhibisyon göstermekle birlikte, en yüksek inhibitör etkiye (%39,33 ± 1,26) solucan DKM ekstresi yol açmıştır.

E. foetida katı gübre EtOH ekstresine ait fraksiyonlar ile solucan DKM ekstresine ait fraksiyonların BChE inhibitör etkileri de Ellman metoduyla ölçülmüş ve sadece katı gübre EtOH ekstresine ait EF-EtOH-7 kodlu fraksiyonun %50'nin üzerinde inhibisyona yol açtığı saptanmıştır (%50,31 ± 4,05, IC₅₀= 52,31 ± 3,04 µg/mL). Sonuçlar Çizelge 4.4. ve 4.5.'te verilmektedir.

Çizelge 4.4. Katı gübre EtOH ekstresine ait fraksiyonların BChE inhibitör etkileri

Fraksiyon kodu	%İnhibisyon ± S.S. ^a (2000 µg/mL ^b)
EF-EtOH-1	- ^c
EF-EtOH-2	15,30 ± 4,90
EF-EtOH-3	17,56 ± 2,07
EF-EtOH-4	-
EF-EtOH-5	-
EF-EtOH-6	8,83 ± 0,30
EF-EtOH-7	50,31 ± 4,05 (IC ₅₀ = 213,7 ± 0,57 µg/mL)
EF-EtOH-8	13,73 ± 2,28
EF-EtOH-9	-
Galantamin (Referans, 1000 µg/mL)	60,30 ± 1,36 (IC ₅₀ = 52,31 ± 3,04 µg/mL)

^aStandart sapma (n: 3), ^bStok konsantrasyon, ^cİnhibisyon gözlenmedi

Çizelge 4.5. Solucan DKM ekstresine ait fraksiyonların BChE inhibitör etkileri

Fraksiyon kodu	%İnhibisyon ± S.S. ^a (2000 µg/mL ^b)
EF-DKM-1	5,7 ± 0,81
EF-DKM-2	15,85 ± 5,27
EF-DKM-3	4,04 ± 1,49
EF-DKM-4	9,39 ± 0,81
EF-DKM-5	17,77 ± 2,53
EF-DKM-6	- ^c
EF-DKM-7	-
Galantamin (Referans, 1000 µg/mL)	60,30 ± 1,36 (IC ₅₀ = 52,31 ± 3,04 µg/mL)

^aStandart sapma (n: 3), ^bStok konsantrasyon, ^cİnhibisyon gözlenmedi

Katı gübre EtOH ekstresine ait fraksiyonların kolajenaz inhibitör etkileri ise Çizelge 4.6.'da sunulmaktadır.

Çizelge 4.6. Katı gübre EtOH ekstresine ait fraksiyonların kolajenaz inhibitör etkileri

Fraksiyon kodu	%İnhibisyon \pm S.S. ^a (2000 μ g/mL ^b)
EF-EtOH-1	11,45 \pm 3,7
EF-EtOH-2	- ^c
EF-EtOH-3	16,63 \pm 1,45
EF-EtOH-4	16,15 \pm 2,65
EF-EtOH-5 - EF-EtOH-10	-
1,10-Fenantrolin (Referans, 1000 μ g/mL)	74,94 \pm 3,98

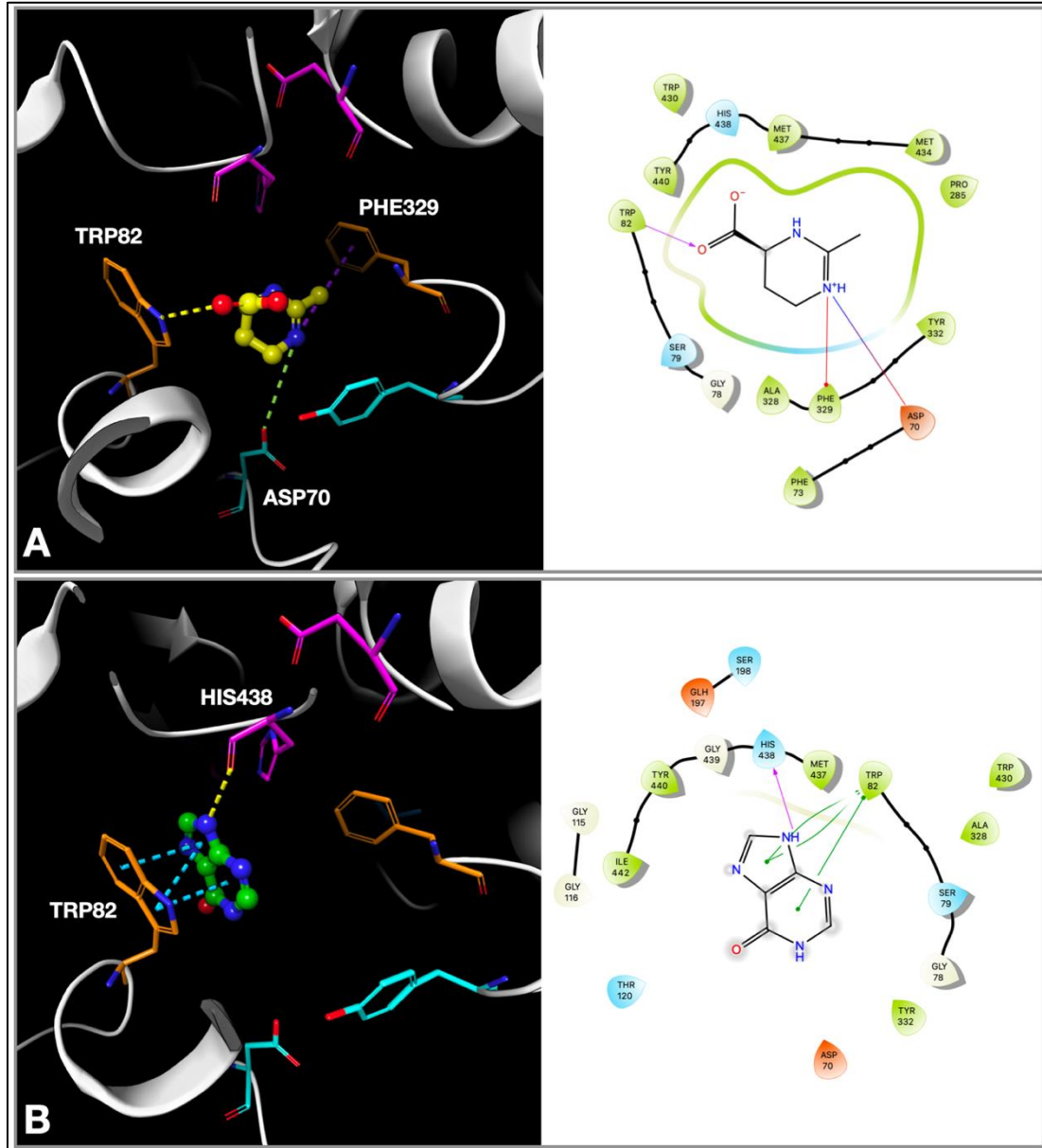
^aStandart sapma (n: 3), ^bStok konsantrasyon, ^cİnhibisyon gözlenmedi

4.3. Moleküler Kenetlenme Bulguları

Solucan EtOH ekstresinde ve BChE'a karşı inhibitör etki gösteren katı gübre EtOH ekstresinde bulunduğu tespit edilen ektoin ve hipoksantin bileşiklerin elimizde mevcut olmaması nedeniyle, *in vitro* deney koşullarında BChE enzim inhibisyonu gerçekleştirilememiştir. Ancak kolinesteraz ailesi enzimlerini azotlu bileşiklerin inhibe edici etkisinin genellikle iyi olması ve klinikte kullanılan kolinesteraz inhibitörü ilaçların azot taşıyan moleküller olması nedeniyle, bahsi geçen ekstrelerde tespit edilen iki azot taşıyan bileşik olan ektoin ve hipoksantin *in silico* deney koşullarında BChE enziminin aktif bölgesiyle meydana getirdiği etkileşimlerin moleküler seviyede incelenmesi amacıyla moleküler kenetlenme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda yapısında inhibitör olarak *N*-[(1-(2,3-dihidro-1*H*-inden-2-il)piperidin-3-il)metil]-*N*-(2-metoksietil)]-2-naftamit taşıyan insan BChE (PDB kodu: 4TPK) kullanılmıştır.

Moleküler kenetlenme çalışmasının sonuçlarına göre, ektoin BChE aktif bölgesinin merkezinde konumlanmış, bağlanma enerjisi -6,53 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Ektoin, yapısındaki karboksilik asit grubuna ait karbonil oksijeni ile oksianyon bölgesine ait amino asitlerden TRP82 ile hidrojen bağı meydana getirmiştir. Bileşiğin aktif bölgede tutunmasını sağlayan diğer etkileşimler ise, karboksilik asit grubuna göre *para* konumda bulunan protonize halka azotunun yine oksianyon bölgesine ait PHE329 aminoasiti ile meydana getirdiği π -katyon etkileşimi ve aktif bölge girişinde periferal anyonik bölge (PAS) aminoasitlerinden ASP70 ile oluşturduğu tuz köprüsüdür. BChE aktif bölgesindeki bağlantı modu incelenen bir diğer bileşik olan hipoksantin ise ektoinden farklı olarak aktif

bölgenin katalitik üçlü kısmına biraz daha yanaşmış ve halka azotlarından N7 üzerinden katalitik üçlü üyelerinden HIS438 aminoasiti ile hidrojen bağı meydana getirmiştir. Hipoksantin için belirlenen diğer etkileşimler, halka ile oksanyon bölgesini oluşturan TRP82 aminoasiti arasında gözlenen π - π etkileşimleri olmuştur. Hipoksantin-BChE kompleksi için bağlanma enerjisi -6,69 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Her iki bileşik için etkileşimler Şekil 4.1.'de verilmektedir.

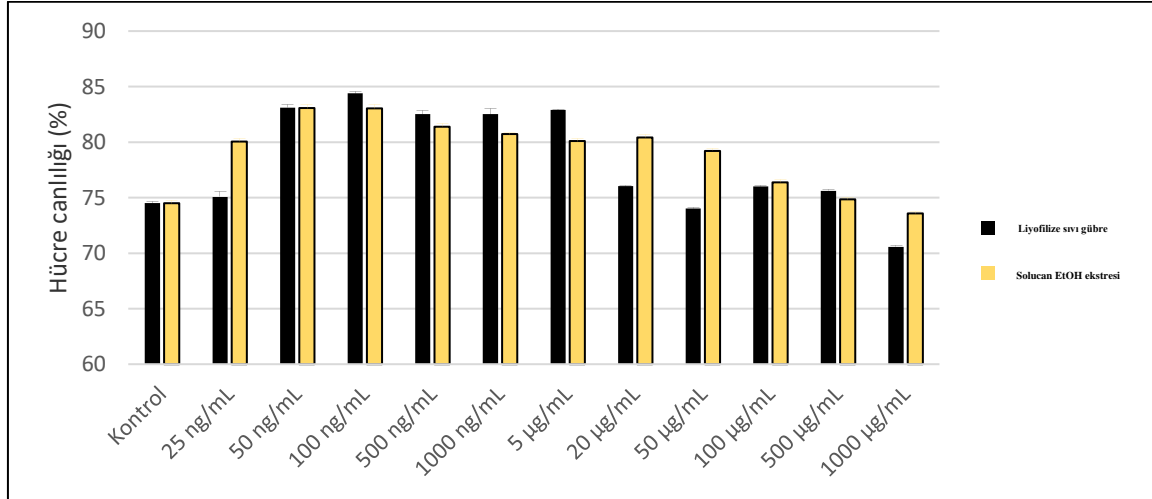


Şekil 4.1. İnsan BChE enzim aktif bölgesinde (PDB kodu: 4TPK) ektoin (A), hipoksantin (B) için belirlenen bağlantı modları ve elde edilen etkileşimlerin 2B şematik gösterimi. (Hidrojen bağları sarı, π - π etkileşimleri turkuaz, π -kasyon etkileşimleri mor, tuz köprü)

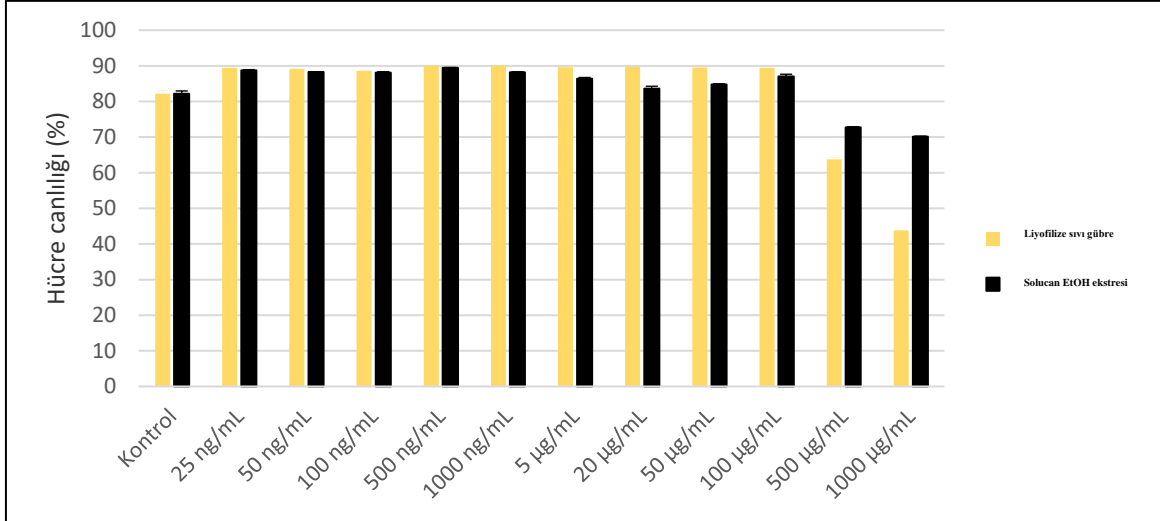
4.4. DP-MKH Hücre Kültürü Deneyine Ait Bulgular

DP-MKH gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi

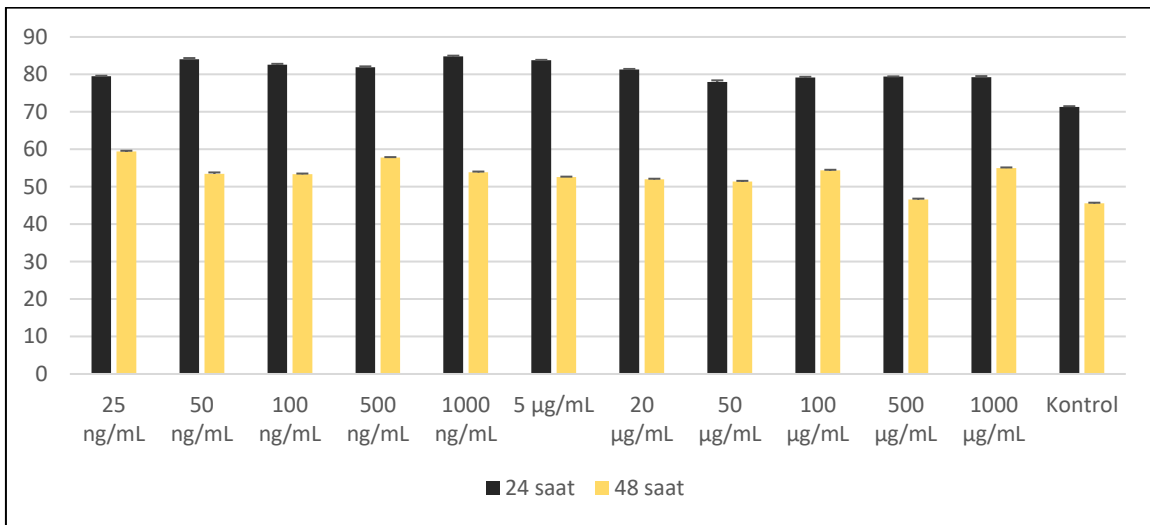
DP-MKH hücrelerinde 24 saat sonunda 100 ng/mL konsantrasyonda *E. foetida* liyofilize sıvı gübre ve solucan EtOH ekstraktları %85 canlılık gösterirken, 48 saat sonunda oran %90'a yükselmiştir (Şekil 4.2. ve 4.3.). Liyofilize sıvı gübre ekstresi 24 saat sonunda 1000 ng/mL'de en iyi sonucu vermiştir (Şekil 4.4.). Solucan EtOH ekstresi 20 µg/mL konsantrasyonda ise 24 saat sonunda hücre canlılığını kontrol grubu ile mukayese edildiğinde %23 oranında uyarılmıştır (Şekil 4.5). Kemikleşme çalışmalarında solucan EtOH ekstresi kullanılmıştır.



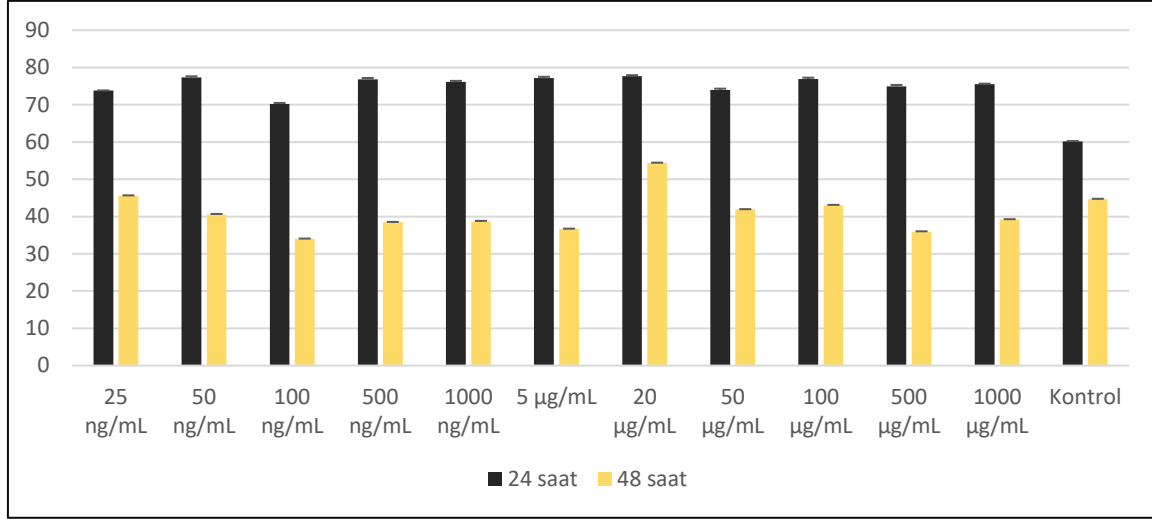
Şekil 4.2. Liyofilize sıvı gübre ve solucan EtOH ekstresi ile 24 saat muamele edilen DP-MKH hücrelerinde canlılık sonuçları



Şekil 4.3. Liyofilize sıvı gübre ve solucan EtOH ekstresi ile 48 saat muamele edilen DP-MKH hücrelerinde canlılık sonuçları



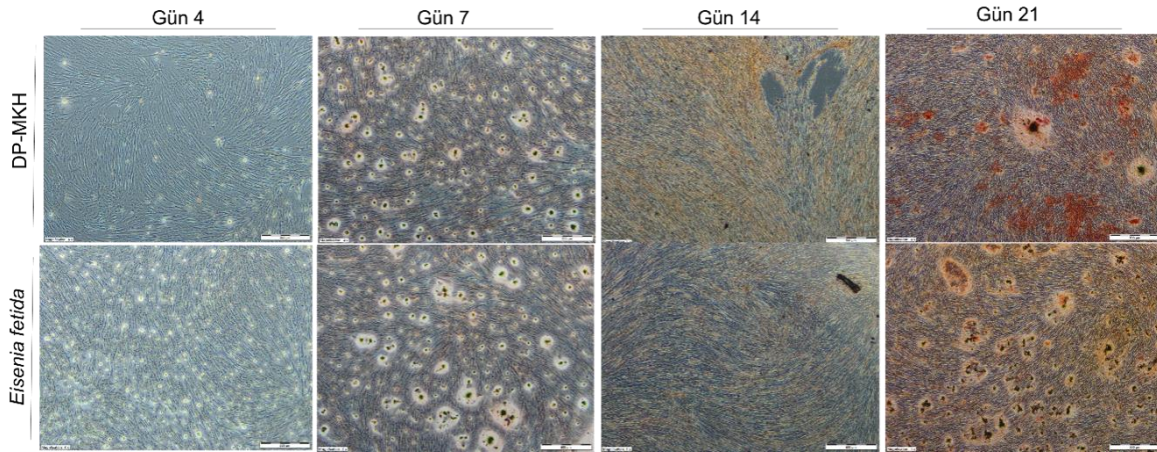
Şekil 4.4. Liyofilize sıvı gübre ve solucan EtOH ekstresi ile 24 ve 48 saat muamele edilen DP-MKH hücrelerinde canlılık sonuçları



Şekil 4.5. *E. foetida* EtOH ekstresi ile 24 ve 48 saat muamele edilen DP-MKH hücrelerinde canlılık sonuçları

DP-MKH kemikleşme özelliklerinin üzerine etkisinin belirlenmesi

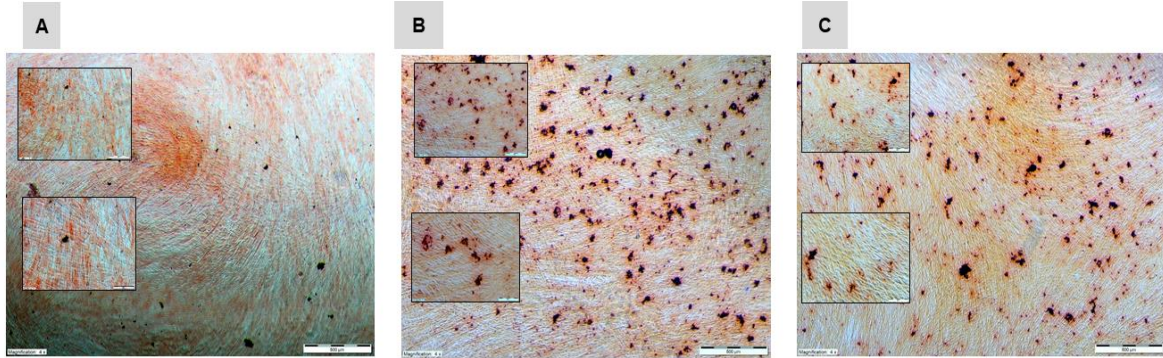
E. foetida solucan EtOH ekstresinin DP-MKH kemikleşme üzerindeki etkisi 4, 7, 14 ve 21. günlerde gerçekleştirilen alizarin kırmızısı boyama yöntemi ile Olympos CKX41 mikroskobu kullanılarak izlenmiştir (Resim 4.1.). Elde ettiğimiz sonuçlara göre; kırmızı ile boyanan matriks ve siyah renkli boyanan kalsiyum granüllerinin solucan EtOH ekstresi ile muamele edilen grupta yoğun izlendiği tespit edilmiştir.



Resim 4.1. *E. foetida* solucan EtOH ekstresi ile muamele edilen DP-MKH hücrelerindeki kemikleşme görüntüleri (4x)

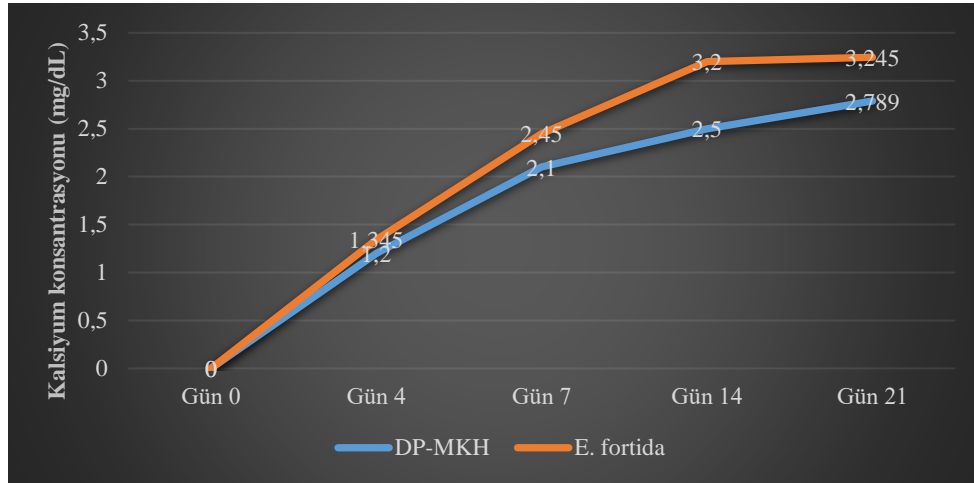
Kemikleşme vasatında 4. ve 14. günlerde solucan EtOH ekstresi ile aralıklı olarak muamele edilen DP-MKH hücreleri (OST-4,14) ile ilk günden itibaren 21 gün boyunca

solucan EtOH ekstresi ile muamele edilen DP-MKH hücrelerinin (OST-CONT) izlendiği farklılaşma çalışmasında, alizarin boyaması görüntülerinde OST-4,14 grubunda matriks boyanmasının daha yoğun olduğu tespit edilmiştir (Resim 4.2.). Kalsiyum granüllerinin kontrol (Resim 4.2.A) ve OST-CONT (Resim 4.2.C) grubundan daha yoğun olduğu görülmüştür.



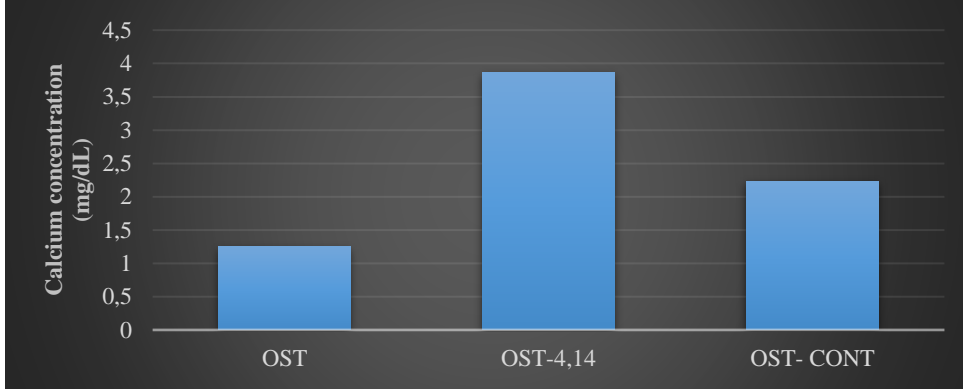
Resim 4.2. *E. foetida* solucan EtOH ekstresi ile kemikleşme yönünde uyarılmış DP-MKH hücreleri (A. Kontrol grubu, B. OST4,14., C. OST-CONT)

E. foetida etkisinin DP-MKH hücrelerinde kemikleşme üzerindeki etkileri kantitatif olarak, DICA 500 kiti ile kalsiyum konsantrasyonu takip edilerek izlenmiştir (Şekil 4.6.).



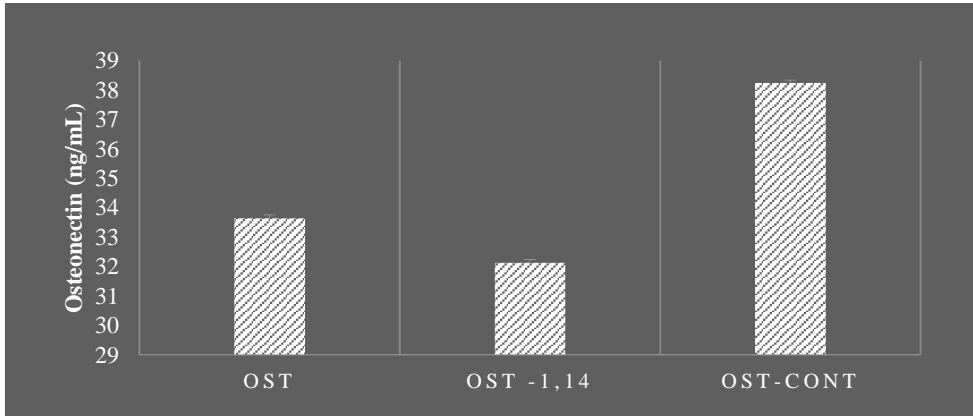
Şekil 4.6. *E. foetida* solucan EtOH ekstresinin DP-MKH hücrelerinde kemikleşmesinde kalsiyum konsantrasyonuna olan etkisi

Alizarin kırmızısı boyamasında izlenen kalsiyum granülleri, konsantrasyonun ölçülmesi ile kantitatif olarak doğrulanmıştır (Şekil 4.7.). OST-4,14 grubunun en yüksek kalsiyum konsantrasyonuna sahip olduğu belirlenmiştir.



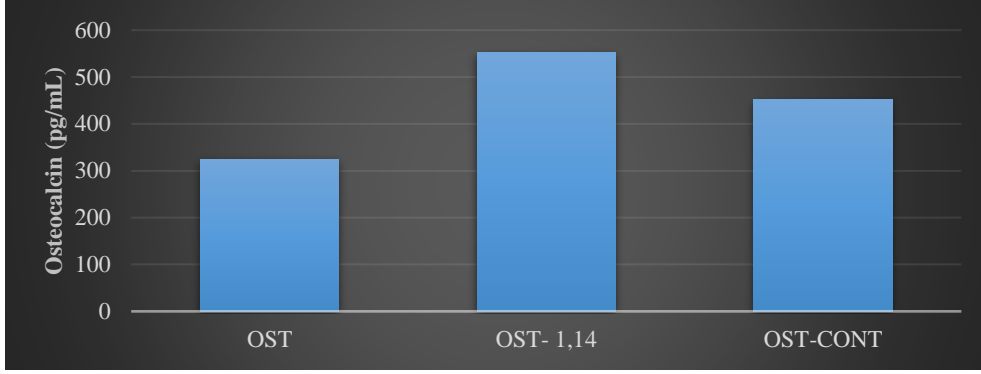
Şekil 4.7. *E. foetida* solucan EtOH ekstresi ile kemikleşmeye yönlendirilen DP-MKH hücrelerinde kalsiyum konsantrasyon miktarları (OST: kontrol grubu, OST-4,14: 4. ve 14. günlerde solucan EtOH ekstresi eklenen DP-MKH hücreleri, OST-CONT: 21 gün süresince solucan EtOH ekstresi eklenen DP-MKH hücreleri)

Kemikleşme erken işareti osteonektin (ON) ve geç kemikleşme işareti (OCN) Elisa Kit yöntemi ile kültür supernatantlarından 21. günde alınan örneklerde araştırılmıştır. Osteonektin; farklılaşmanın 14. gününde kültür süpernatantında en yüksek seviyeye ulaşmakta ve stabilitesi az olduğu için 21. günde azalmaktadır. Şekil 4.8.'de OST 4,14 grubunda ON miktarı en az olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç, farklılaşmanın erken başladığı şeklinde yorumlanmıştır.



Şekil 4.8. *E. foetida* solucan EtOH ekstresi ile kemikleşmeye yönlendirilen DP-MKH hücrelerinde osteonektin miktarları (OST: kontrol grubu, OST-4,14: 4. ve 14. günlerde solucan EtOH ekstresi eklenen DP-MKH hücreleri, OST-CONT: 21 gün süresince solucan EtOH ekstresi eklenen DP-MKH hücreleri)

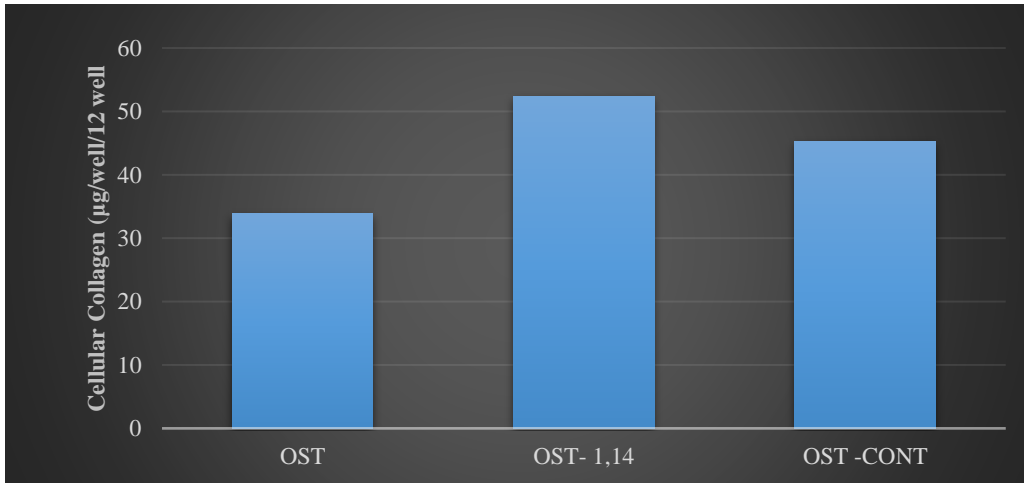
Osteokalsin farklılaşmada 14. günden itibaren oluşmaya başlamış olup, OST-4,14 grubunda en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. Hücrelerin osteoblastik hücreye dönüşmüş olduğu ELISA kiti ile protein seviyesinde gösterilmiştir.



Şekil 4.9. *E. foetida* solucan EtOH ekstresi ile kemikleşmeye yönlendirilen DP-MKH hücrelerinde osteokalsin miktarları (OST: kontrol grubu, OST-4,14: 4. ve 14. günlerde solucan EtOH ekstresi eklenen DP-MKH hücreleri, OST-CONT: 21 gün süresince solucan EtOH ekstresi

Ekstraselüler matriks (ESM) komponentlerine *E. foetida* solucan EtOH ekstresinin etkisini belirlenmesi

E. foetida'nın solucan EtOH ekstresinin DP-MKH ekstraselüler matriksinde yer alan kolajen miktarına olan etkisi Şekil 4.10.'da gösterilmektedir. Elde ettiğimiz bulgulara göre; OST-4,14 grubunun en yüksek kolajen miktarına sahip deney grubu olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.10. *E. foetida*'nın solucan EtOH ekstresinin DP-MKH ekstraselüler matriksinde yer alan kolajen miktarına olan etkisi

4.5. *E. foetida* Solucan EtOH Ekstresinde Yapılan LC-Q-ToF-MS Analizlerine Ait Bulgular

E. foetida solucan EtOH ekstresinin kimyasal profilinin belirlenmesi yüksek çözünürlüklü LC-Q-ToF-MS ile gerçekleştirilmiştir. Pozitif iyonlaşma modunda MS ve MS-MS

analizleri sonucunda elde edilen spektrum ve iyon değerleri, Metlin Metabolit veritabanı ve literatür verileriyle karşılaştırılarak eşleşme ve tanımlamalar sağlanmıştır. Elde edilen ana iyon değeri ile örtüşen madde olasılıkları, parçalanma iyonları ile de değerlendirilerek tanımlama işlemi yapılmıştır. KS ve UV sinyalleri ile teşhis edilen 20 adet bileşiğin listesi aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.9.).

Çizelge 4.7. Solucan EtOH ekstresi LC-Q-ToF-MS analizi ile bulunan bileşikler

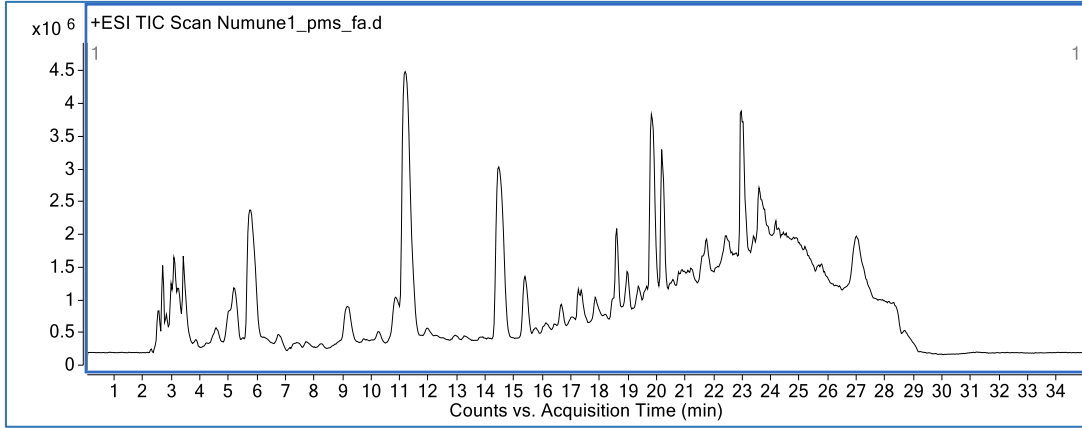
No.	Tespit edilen bileşik	R _t (dk)	Kapalı formül	M+H iyonu
1	Histidin	2,53	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	156,0753
2	Lizin	2,53	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	147,1119
3	Nε,Nε,Nε-Trimetillizin	2,63	C ₉ H ₂₁ N ₂ O ₂	189,1587
4	N,N-Dimetilhistidin	2,70	C ₈ H ₁₃ N ₃ O ₂	184,1072
5	Kolin	2,83	C ₅ H ₁₄ NO	104,1060
6	Valin	3,06	C ₅ H ₁₁ NO ₂	118,0839
7	Ektoin	3,25	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	143,0806
8	Metionin	4,56	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	150,0574
9	Hipoksantin	5,22	C ₅ H ₄ N ₄ O	137,0450
10	3-Amino-3-(4-hidroksifenil)propanoat	6,70	C ₉ H ₁₁ NO ₃	182,0798
11	Lösin/İzolösin	6,76	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132,1008
12	Tirozin	6,78	C ₉ H ₁₁ NO ₃	182,0800
13	Lösin/İzolösin	7,35	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132,1011
14	N-Hidroksil-triptamin	9,19	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	177,1018
15	Fenilalanin	11,40	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166,0855
16	1-Naftilamin	14,77	C ₁₀ H ₉ N	144,0800
17	Triptofan	15,39	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	205,0965
18	OEP-3121 ^a	18,64	C ₂₇ H ₃₅ N ₅ O ₅	510,2727
19	VQ-5 (VSSVQ) ^b	19,59	C ₁₈ H ₄₀ N ₅ O ₁₂	519,2713
20	SP-8203 ^c	19,95	C ₂₈ H ₃₄ N ₆ O ₅	535,2682

^aLiu, Sun, Wang, Li, and Liu (2004)künyeli yayında tespit edilen peptit türevi

^bLi vd. (2017) künyeli yayında tespit edilen peptit türevi

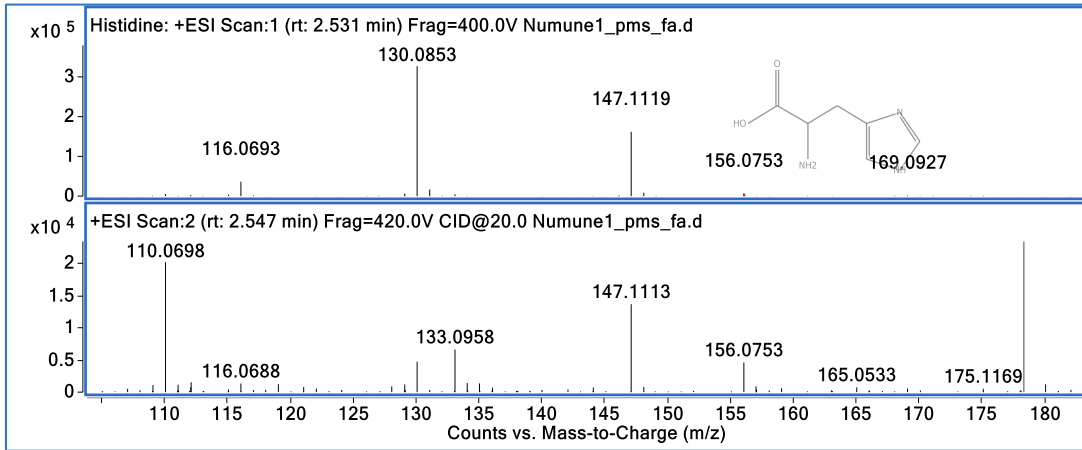
^cKruk, Dziurka, & Płytycz (2019)künyeli yayında tespit edilen peptit türevi

Solucan EtOH ekstresinde LC-Q-ToF-MS analizleri sonucunda tespit edilen bileşikler, genellikle aminoasit ve peptit türevi primer metabolitler olup, ekstrenin toplam iyon kromatogramı (total ion chromatogram, TIC) Şekil 4.11.'de verilmektedir.

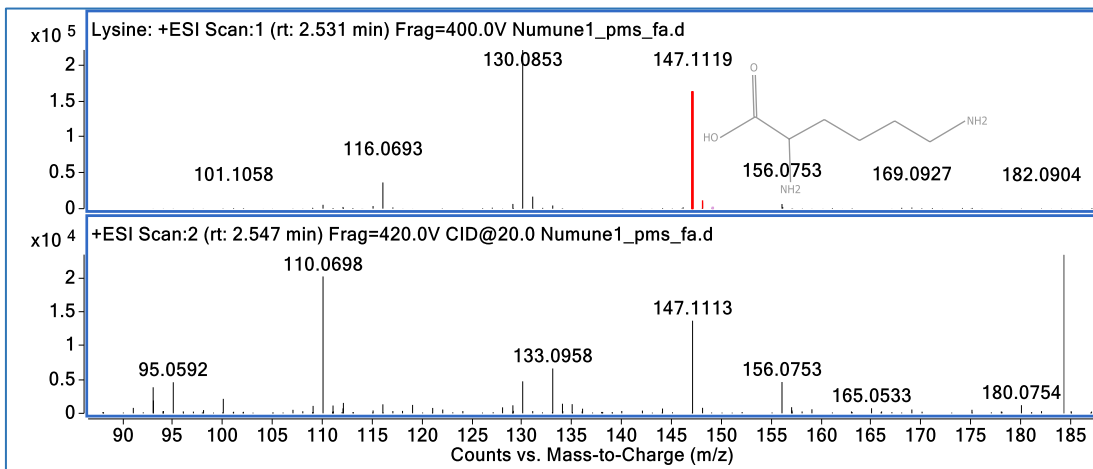


Şekil 4.11. Solucan EtOH ekstresine ait TIC

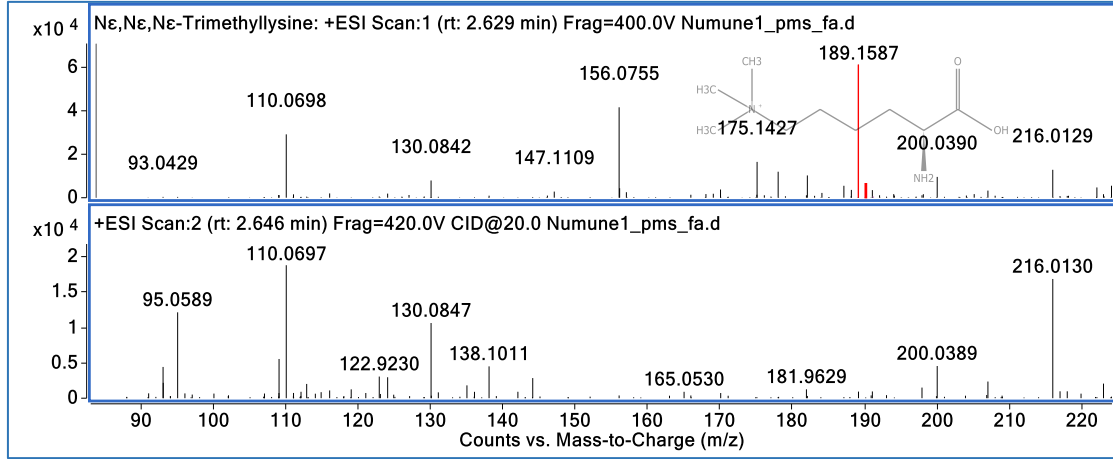
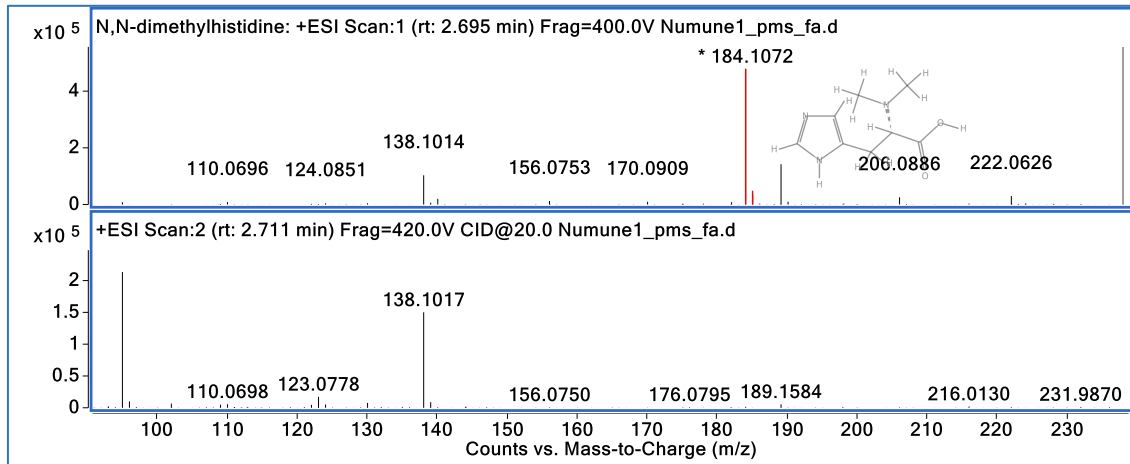
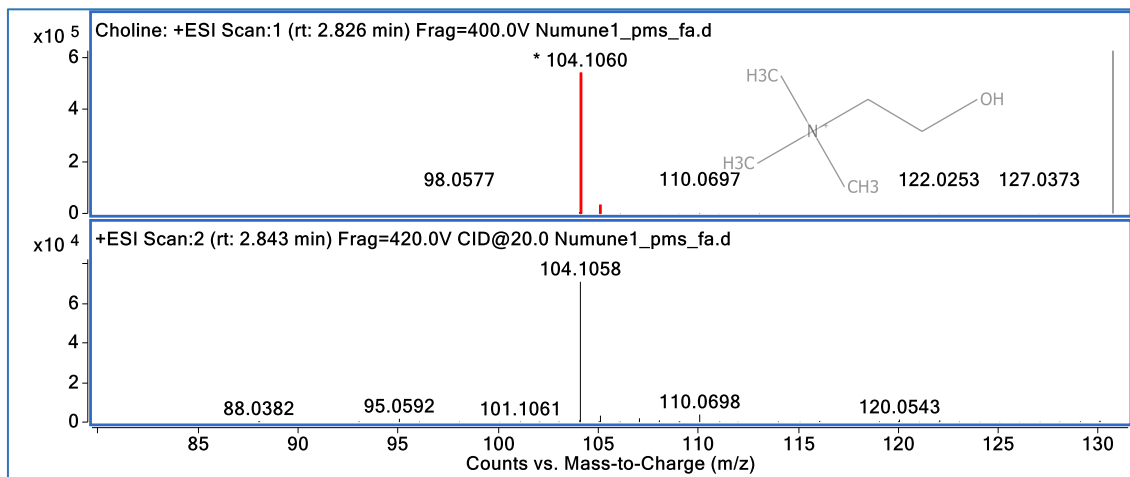
Ekstrede tespit edilen bileşiklere ait TIC'ları Şekil 4.12-4.30. arasında verilmektedir.



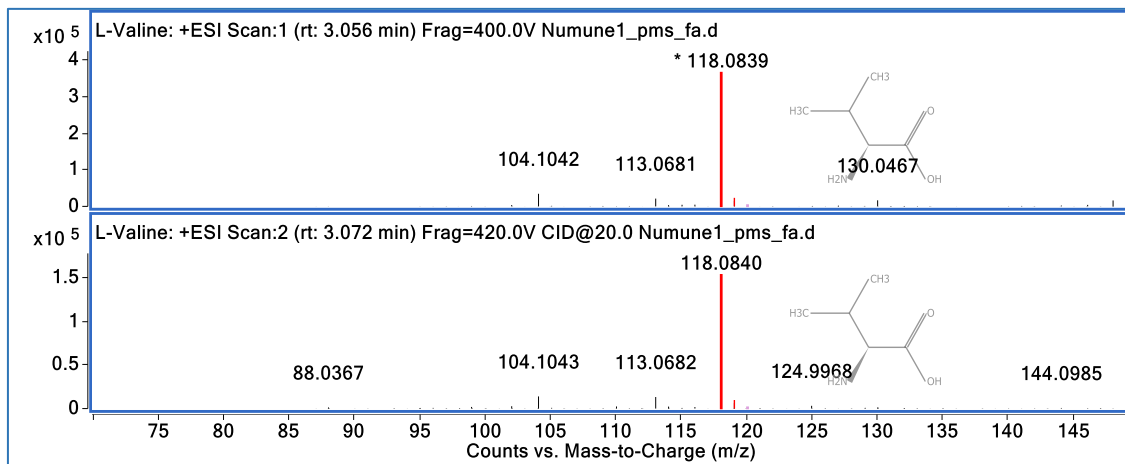
Şekil 4.12. Histidine ait TIC ve KS



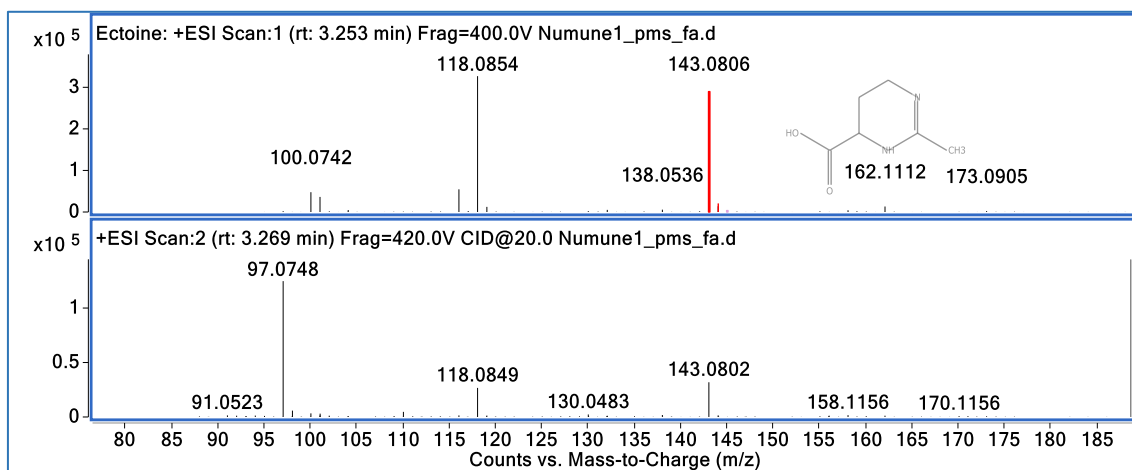
Şekil 4.13. Lizine ait TIC ve KS

Şekil 4.14. *N_ε,N_ε,N_ε*-Trimetillizine ait TIC ve KSŞekil 4.15. *N,N*-Dimetilhistidine ait TIC ve KS

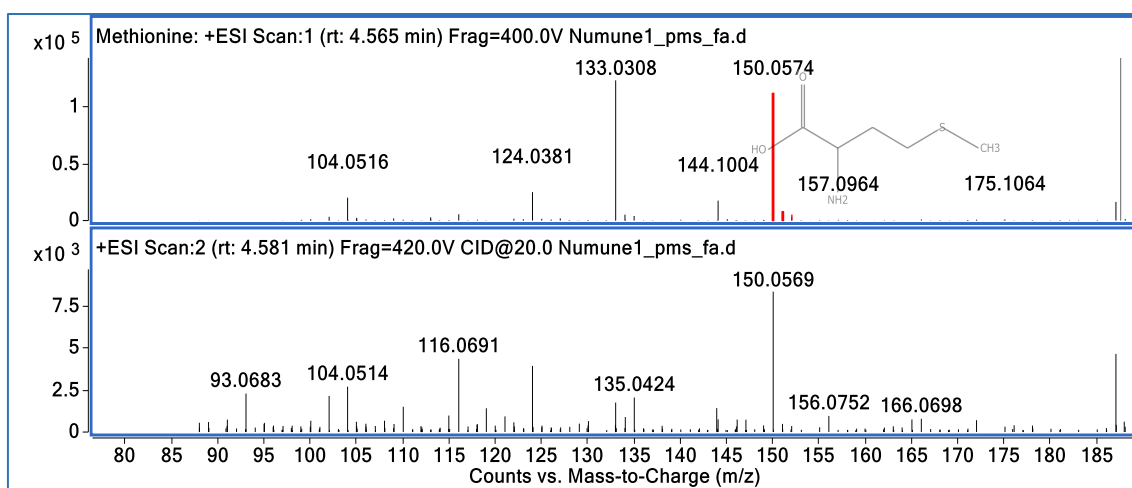
Şekil 4.16. Koline ait TIC ve KS



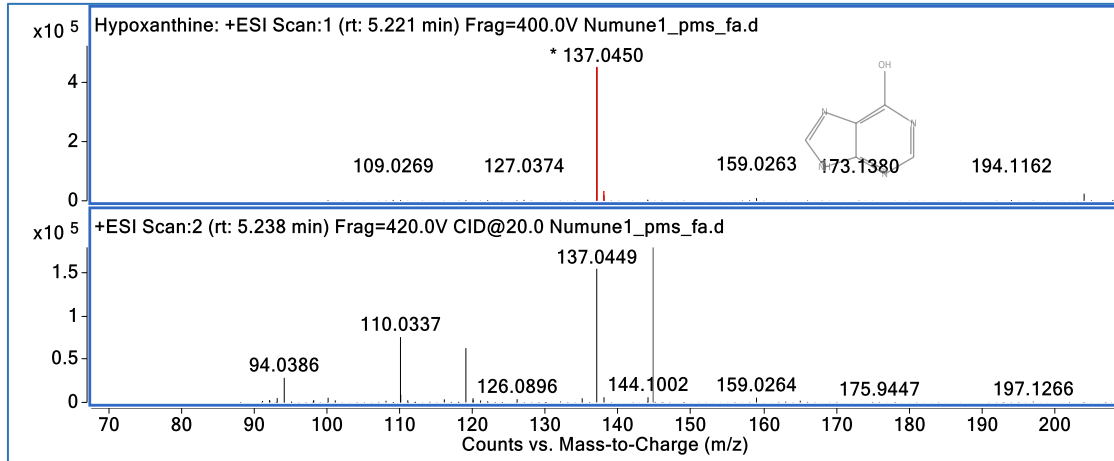
Şekil 4.17. Valine ait TIC ve KS



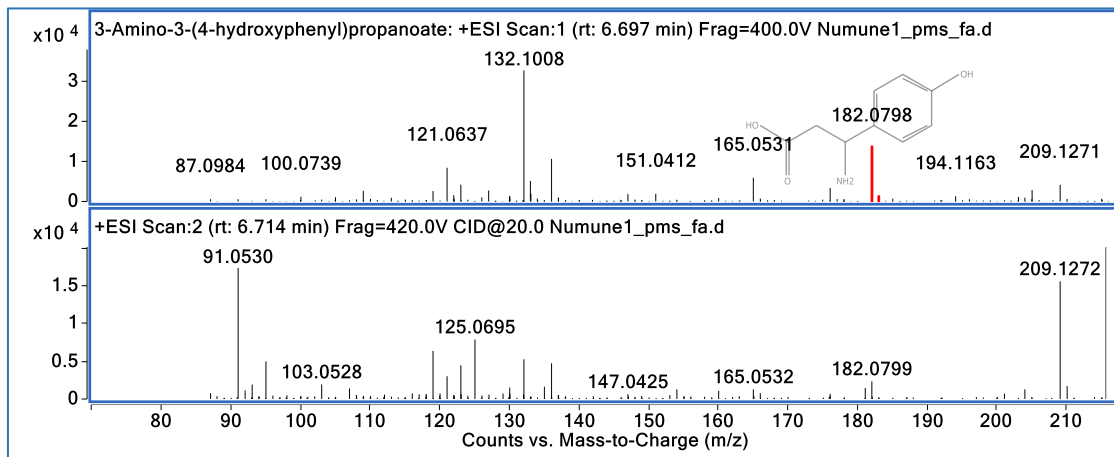
Şekil 4.18. Ectoine ait TIC ve KS



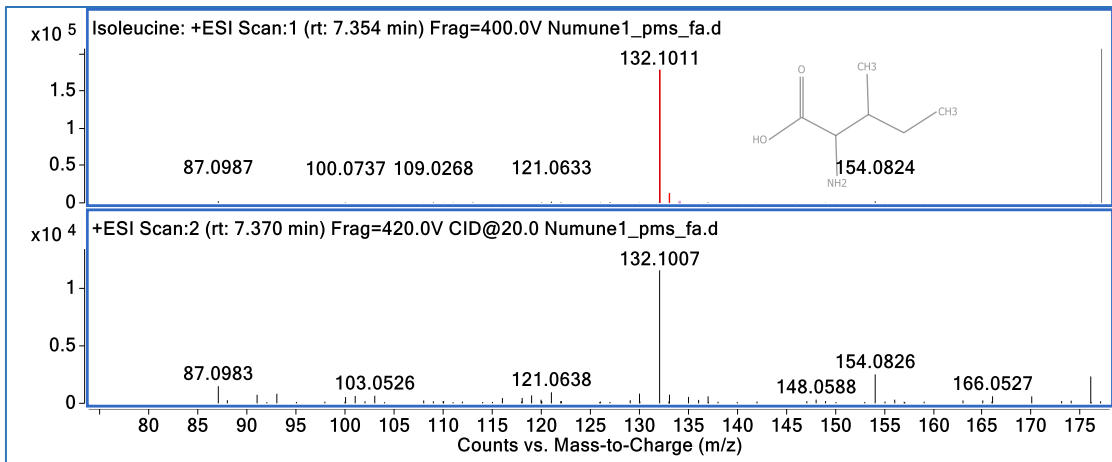
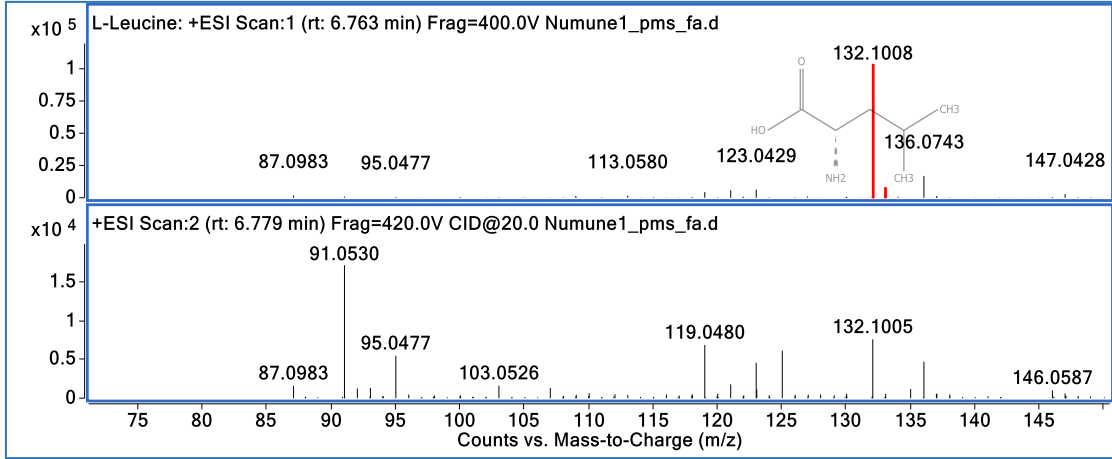
Şekil 4.19. Metionine ait TIC ve KS



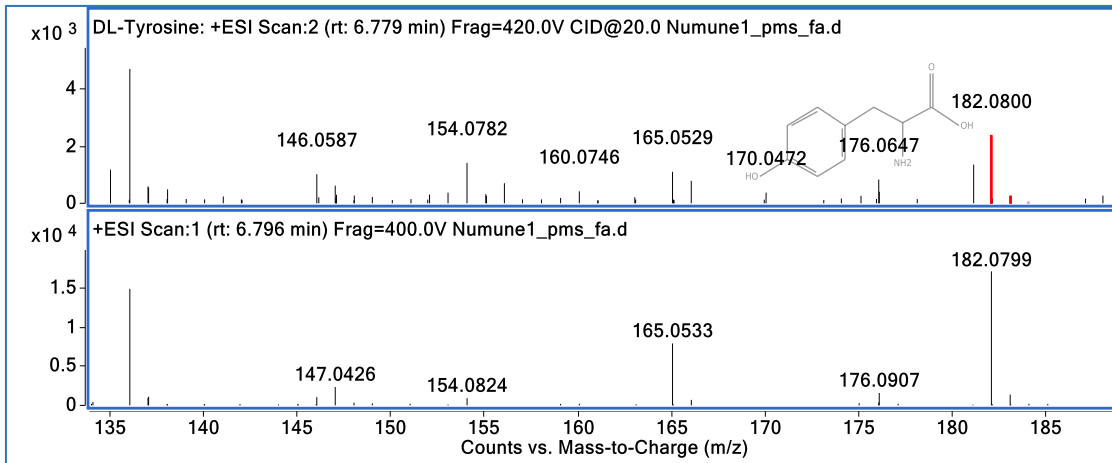
Şekil 4.20. Hipoksantine ait TIC ve KS



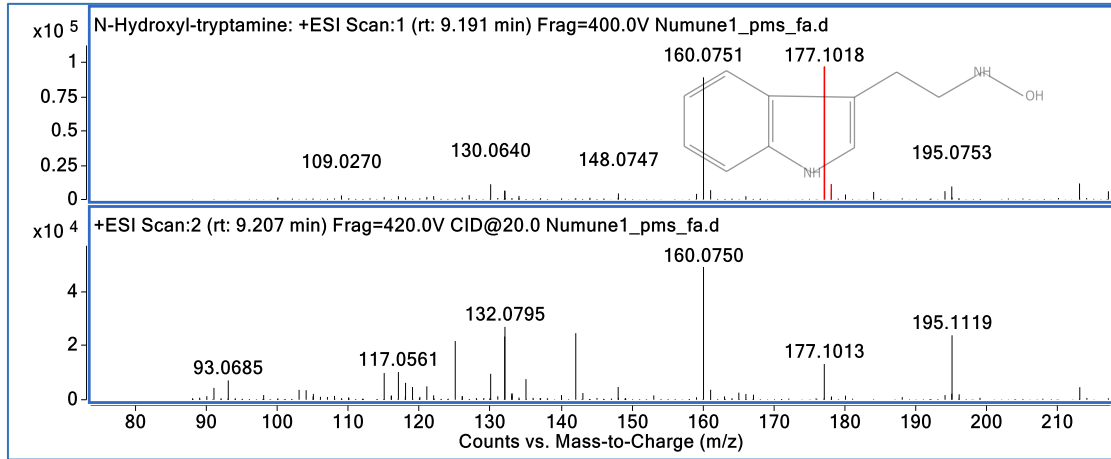
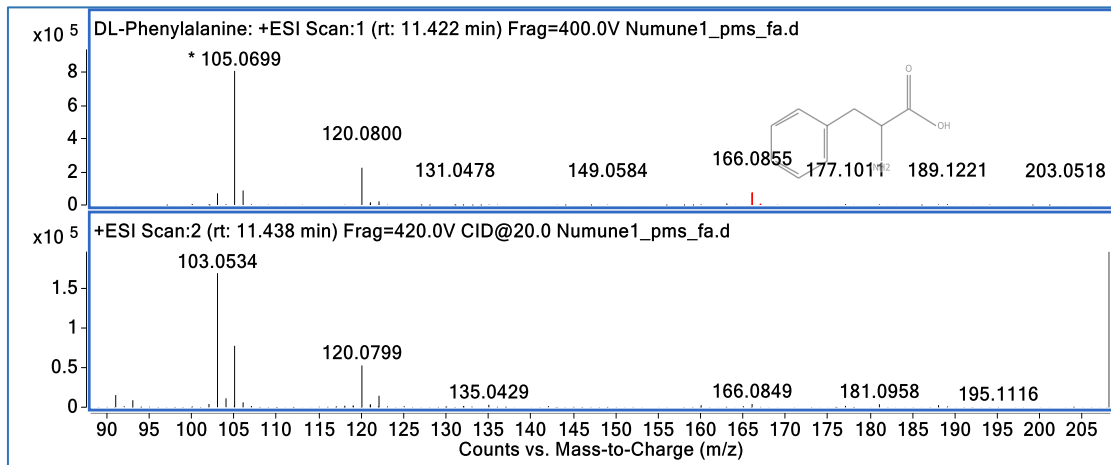
Şekil 4.21. 3-Amino-3-(4-hidroksifenil)propanoata ait TIC ve KS



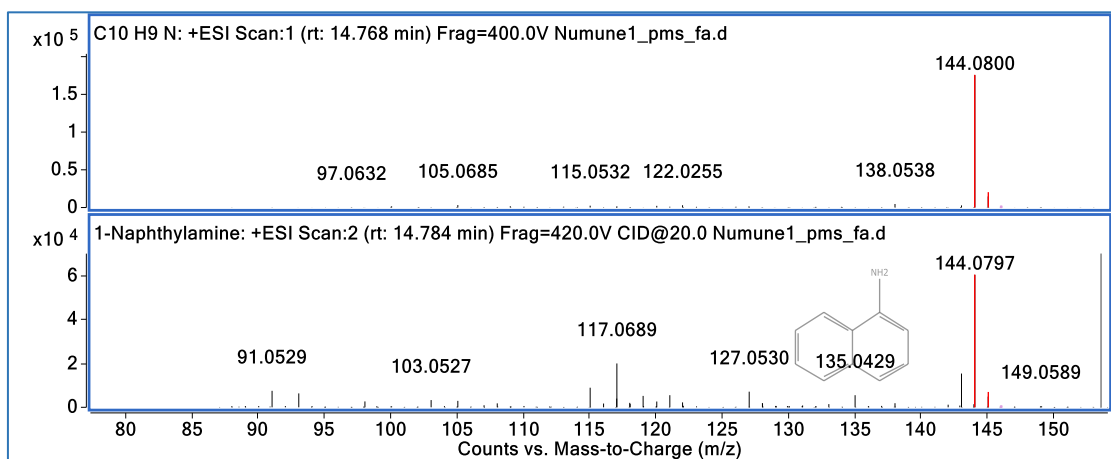
Şekil 4.22. Lösin (üstteki)/izölösine (alttaki) ait TIC ve KS



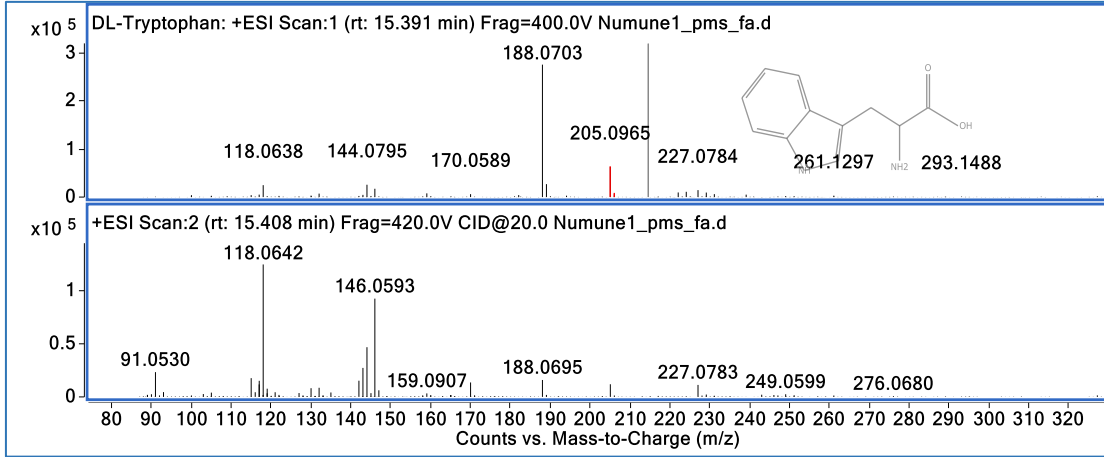
Şekil 4.23. Tirozine ait TIC ve KS

Şekil 4.24. *N*-Hidroksil-triptamine ait TIC ve KS

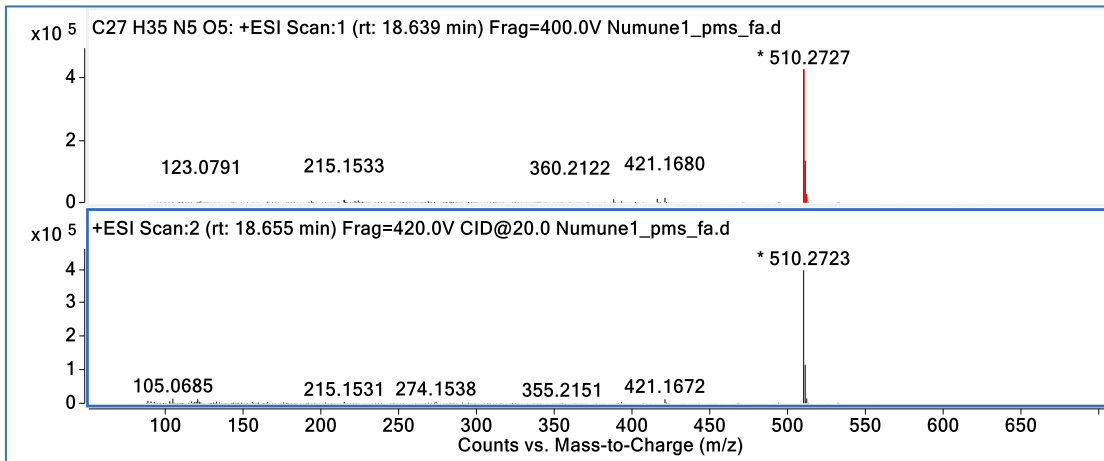
Şekil 4.25. Fenilalanine ait TIC ve KS



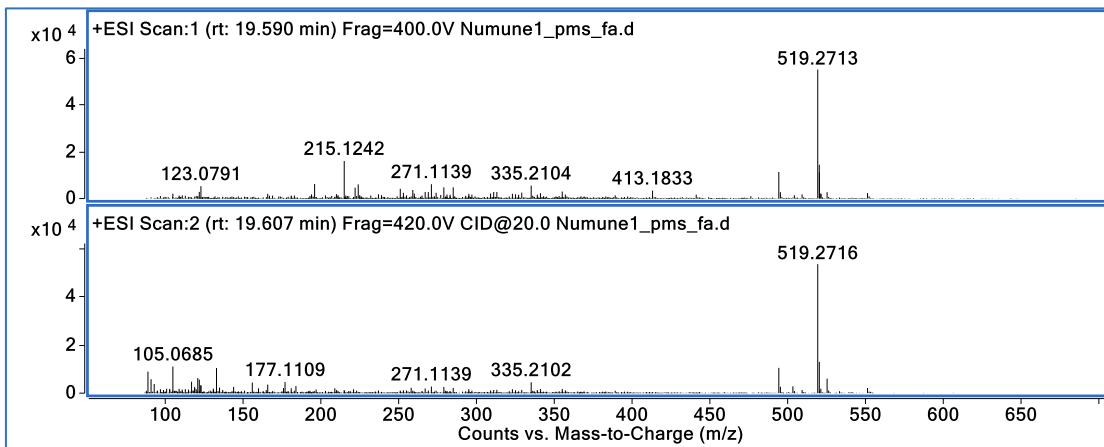
Şekil 4.26. 1-Naftilamine ait TIC ve KS



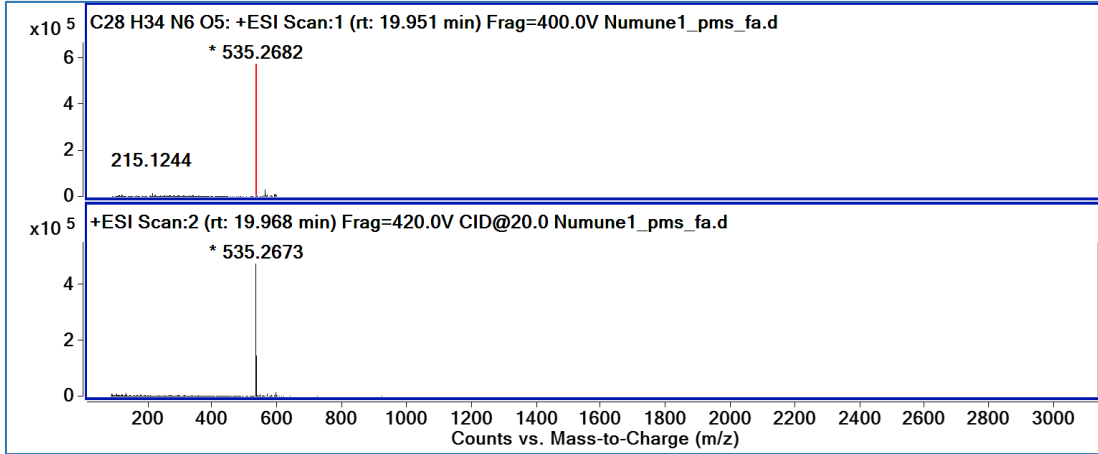
Şekil 4.27. Triptofana ait TIC ve KS



Şekil 4.28. OEP-3121'e ait TIC ve KS

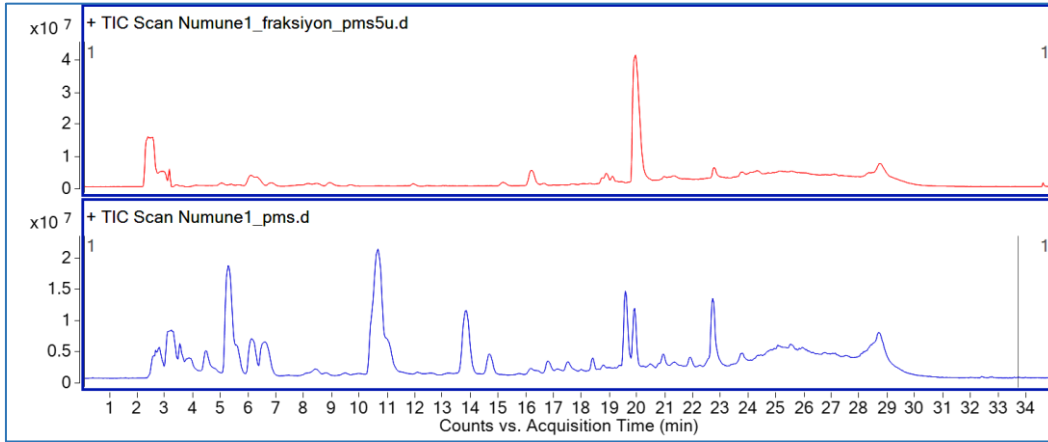


Şekil 4.29. VQ-5'e ait TIC ve KS

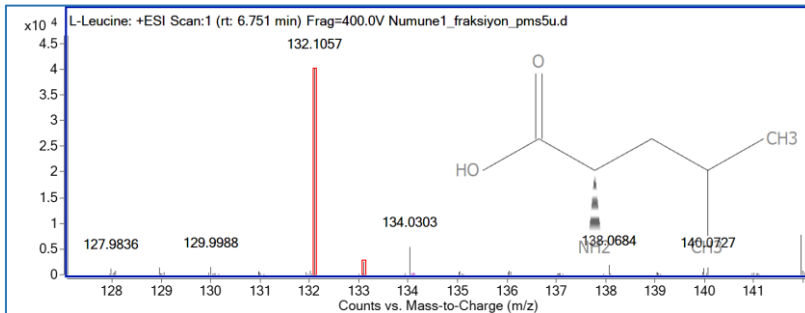


Şekil 4.30. SP-8203'e ait TIC ve KS

Katı gübre EtOH ekstresinden KK ile elde edilen ve BChE'a karşı $50,31 \pm 4,05$ ($IC_{50} = 213,7 \pm 0,57 \mu\text{g/mL}$) inhibisyon gösteren EF-EtOH-7 kodlu fraksiyon da LC-Q-ToF-MS ile analiz edilmiş, ana bileşiklerden biri olan ve 5.-6. dk arasında görülen pikin lösin/izolösine ait olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.31.).



Şekil 4.31. EF-EtOH-7 kodlu fraksiyona ait TIC



Şekil 4.32. EF-EtOH-7 kodlu fraksiyonda tespit edilen lösin/izolösine ait KS

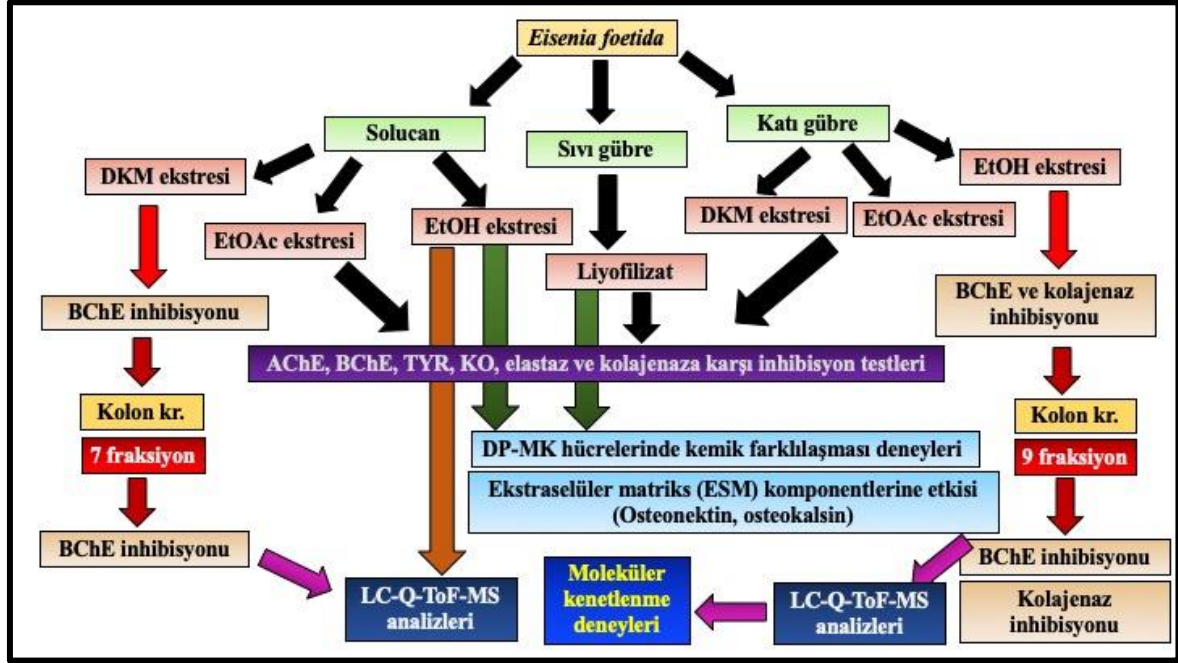
5. TARTIŞMA

Farmakognozi genel anlamıyla “bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar ve deniz canlıları gibi biyolojik/doğal kökenli ilaç hammaddelerini inceleyen bilim dalı” olarak tanımlanmaktadır. Bu geniş biyolojik çeşitlilik içinde hayvansal kaynaklar üzerinde yapılan araştırmalar da yeni ilaç keşfi açısından çok önemlidir. Diğer yandan, kadim zamanlardan beri insanoğlu hayvanları doğrudan veya drogları şeklinde şifa amacıyla kullanmıştır. Örneğin 13. yüzyılda Bizans İmparatorluğu zamanında Nikolaos Myrepsos adlı hekim tarafından yazılmış olan Dynameron adlı tıbbi eserde 2667 reçete verilmiş ve 344 adet reçetede hayvansal drogların tedavide kullanımından bahsedilmiştir (Valiakos, Marselos, Grafakou, Skaltsa ve Sakellaridis, 2021). En yaygın kullanılan hayvansal ürünler olan bal ve süt Dynameron’da verilen 2136 reçetede yer almıştır. Modern zamanlarda hayvansal türlerden izole edilen model moleküllerin modifikasyonu ile elde edilen ve klinikte kullanılmaya başlanan yeni ilaç moleküllerine pek çok örnek verilebilir. Yerkürenin yaklaşık %70’ini kaplayan denizler ve okyanuslar ile tatlı sularda yaşayan sucül canlılar da ilaç keşfi için büyük bir hazine niteliğindedir. “Deniz Farmakognozisi” olarak bilinen bu alanda yapılan çalışmalar için deniz (sucül) canlıları çok önemli bir hedeftir. Örneğin Karayip Denizi’nde yaşayan *Tethya crypta* adlı deniz süngerinden izole edilen nükleozit analogları olan spongoüridin ve spongotimidin model alınarak geliştirilen asiklovir (Zovirax[®], Aklovir[®]), günümüzde *Herpes simplex* virüsüne karşı kullanılan etkili antiviral ilaç etken maddelerinden biridir (Bergmann ve Feeney, 1950). Bahsi geçen nükleozit analoglarından hareketle yine klinikte kullanılan Ara-C adlı antikanser ajan sentezlenmiştir (Bergmann ve Feeney, 1951). Bir çeşit kertenkele olan ve “Gila monster” olarak da bilinen *Heloderma suspectum*’un venomundan izole edilen ekzendin-4 adlı peptid model alınarak geliştirilen ekzenatit de glukagon-benzeri peptid-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) agonistidir (Parkes, Mace ve Trautmann, 2013). Günümüzde Byetta[®] adıyla tip-2 diyabete karşı kullanılmakta olup, ülkemizde de eczanelerde yerini almıştır. Yılan venomları da ilaç araştırmalarında yoğun çalışılan hedef biyolojik materyallerdendir. Örnek olarak *Trimeresurus gramineus*, *Agkistrodon rhodostoma* ve *A. halys* adlı yılan türlerinin venomlarından elde edilen ve sisteince zengin polipeptid türevleri olarak aydınlatılan disintegrinler, antiplatelet etkili ilaç etken maddeleri olarak yakın zamanda klinikte kullanılmaya başlanmıştır (Kuo, Chung ve Huang, 2019). Hayvansal kaynaklı ilaç etken maddelerine daha pek çok örnek verilebilir, ancak solucanlar da üzerinde dikkate

değer sayıda ilaç araştırmasına kaynak teşkil etmiş bir hayvansal bir gruptur. Annelida takımına mensup olan solucanların da insanoğlu tarafından halk tıbbında gıda ve tedavi amacıyla kullanıldıkları bilinmektedir (Drumond, Guimarães ve da Silva, 2015; Borah ve Prasad, 2017; Luo vd., 2018; Loko vd., 2019; Hughes, Côrtes-Figueira ve Drumond, 2019). Solucanların “kaybedilen veya ampüte vücut kısımlarını yenileme” olarak tanımlanan rejenerasyon yetenekleri de araştırmacıların ilgisini çekmekte ve rejenerasyonun biyolojik mekanizması incelenmektedir (Müller, 2004; Gopi Daisyvd., 2016; MacCord ve Maienschein, 2019; Bae vd., 2020). Diğer yandan, solucanların çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip aminoasitler, peptitler, proteinler, enzimler gibi primer metabolitler ile bazı sekonder metabolitleri içerdiği de bilinmektedir (Haggag ve Khalaf-El-Duweini,1958; Lassalle, Lassègues ve Roch,1993; Sukumwang, Bieger ve Hornykiewicz,1972; Ukena vd., 1995; Rault, Mazzia ve Capowiez, 2007; Sukumwang ve Umezawa, 2013; Griffith vd., 2017; Schenk ve Hoeger, 2020). Bahsedilen nedenlerle bitkisel kaynaklara göre nispeten daha az çalışılan hayvansal türler üzerinde de Farmakognozik açıdan araştırmaların ihmal edilmemesi elzem görünmektedir.

“*Eisenia foetida* (Savigny) Adlı Solucan Türüne Ait Ekstrelerin Enzim İnhibitör Etkileri Yönünden İncelenmesi” adlı doktora tezimizde, hayvansal bir tür olarak *E. foetida* adlı solucan türü bireyleri ile katı gübresinden hareketle elde edilen DKM, EtOAc ve EtOH ekstraktları ile sıvı (liyofilize) gübresinin, laboratuvarımızda hâlihazırda yürütülen testler olması nedeniyle, AChE, BChE, TYR, elastaz, kolajenaz ve KO olmak üzere 6 adet enzime karşı inhibitör kapasiteleri incelenmiştir. İlâveten diğer solucan türleri gibi *E. foetida*'nın da kendini rejenere edebilme yeteneği göz önüne alınarak, ekstraktların nöral krest kökenli dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin (DP-MKH) kemikleşme ve farklılaşmasındaki rolü ile ekstraselüler matriks komponentlerine etkisi araştırılmıştır. BChE'a karşı inhibisyon gösteren solucan DKM ekstresi ile katı gübre EtOH ekstresi KK'ne uygulanmış ve her iki ekstreden elde edilen fraksiyonların tekrar BChE inhibitör etkileri tespit edilmiştir. Katı gübre EtOH ekstresi kolon fraksiyonlardan sadece bir tanesi (EF-EtOH-7) %50'nin üzerinde inhibisyon (%50,31 ± 4,05, IC₅₀= 213,7 ± 0,57 µg/mL) göstermiş, ancak solucan DKM ekstresinin kolon fraksiyonlarının hepsi %50'nin altında inhibisyona yol açmıştır. Bu nedenle EF-EtOH-7 kodlu fraksiyonda LC-Q-ToF-MS analizi yapılmış ve majör bileşik teşhis edilmiştir. Diğer yandan DP-MKH tipi pulpa mezenkimal kök hücrelerinde test edilen solucan EtOH ekstresi LC-Q-ToF-MS ile analiz edilmiş ve çoğu primer metabolit (aminoasit ve peptit) olmak üzere 20 adet bileşik teşhis edilmiştir.

E. foetida ekstreleri üzerinde tez kapsamında yaptığımız çalışmalar Şekil 5.1.'de şematik olarak verilmektedir.

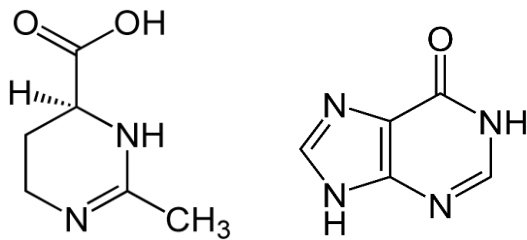


Şekil 5.1. *E. foetida* ekstreleri üzerinde tez kapsamında yaptığımız çalışmalar

Solucan EtOH ekstresinde varlığını belirlediğimiz histidin, lizin, valin, metionin, lösin/izolösin, tirozin, fenilalanin ve triptofan, *E. foetida*'da daha önce de teşhis edilmiştir. Örneğin Japonya'da yaşayan *E. foetida*'nın sulu ekstresinde alanin, glisin, treonin, serin, asparagin, aspartik asit, lizin, histidin, ornitin, sistin, lösin ve izolösin bulunmuştur (Whitfield Åslund, Celejewski, Lankadurai, Simpson ve Simpson, 2004; Yoshii, Ogasawara, Wada, Yamamoto ve Inouye, 2020). *E. foetida*'nın solömik sıvısı başta olmak üzere proteince çok zengin olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Bulgularımızda solucan EtOH ekstresinde teşhis ettiğimiz ve molekül ağırlıkları 500 civarında olan 3 adet peptidin (OEP-3121, VQ-5 ve SP-8203) de daha önce bu solucan türünde bulunduğu bildirilmiştir (Liu, Sun, Wang, Li ve Liu, 2004; Li d., 2017; Kruk, Dziurka ve Płytycz, 2019). Yine literatür verileri ile tutarlı olarak, solucan EtOH ekstresinde varlığını tespit ettiğimiz, insan ve hayvanlarda bulunan, kas kasılmalarında, ağrı cevabının ortaya çıkmasında ve beyin fonksiyonlarında rol oynayan bir nörotransmitter olan kolin de *E. foetida*'da daha önce rapor edilmiştir (Sugiura vd., 1995). Kolin özellikle bu solucanda gliserofosfolipitler ile kompleks yapmış halde bulunmaktadır. LC-Q-ToF-MS analizlerimiz sonucunda *E. foetida*'da teşhis ettiğimiz ektoinin ise kimyasal yapısı 1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-4-

pirimidinkarboksilik asit olup, bakteriyel bir metabolit olarak tanımlanmıştır (Şekil 5.2.). *Brevibacterium linens*, *Halomonas elongata*, *Marinococcus halophilus*, *Pseudomonas stutzeri*, *Escherichia coli* ve *Halorhodospira halophila* gibi bakterilerde bulunduğu bildirilen ektoin, bakterilerin aşırı tuzluluk, kuraklık, sıcaklık ve pH gibi koşullara direncini artıran ve koruma sağlayan bir bileşik olarak nitelendirilmektedir (Parwata, Wahyuningrum, Suhandono ve Hertadi, 2019; Chen, Yuan, Wang, Chien ve Wei, 2020; Bilstein, Heinrich, Rybachuk ve Mösges, 2021; Fatollahi, Ghasemi, Yazdian ve Sadeghi, 2021). Mikroalglerde de tespit edilen ektoinin su-bağlayan bir molekül olduğu ve ozmoprotektan özelliği olduğu, bu nedenle bakterilerde ve mikroalglerde ozmotik strese karşı korunma sağladığı bildirildiğinden (Bownik ve Stępniewska, 2016; Fenizia, Thume, Wirgenings ve Pohnert, 2020), *E. foetida*'da da bu amaçla sentezlendiği düşünülebilir. Yine bu özelliği nedeniyle insanlarda cilt korunması, güneş ışığından korunma ve gözyaşı kuruluğu için kullanımının faydalı olabileceği bildirilmiştir (Bilstein, Heinrich, Rybachuk ve Mösges, 2021). Ancak literatür araştırmalarımız sonucunda, ektoinin varlığı daha önce *E. foetida* da dahil olmak üzere daha önce herhangi bir solucan türünde bildirilmemiştir. Bu nedenle *E. foetida*'da ve herhangi bir solucan türünde ektoin bileşiğinin varlığı ilk defa tez çalışmamız kapsamında bildirilmektedir.

E. foetida'da teşhis ettiğimiz pürin türevi nükleozit analogu hipoksantin, daha önce Çin kökenli *E. foetida* örneklerinde de tespit edilmiş olup, bulgularımız ile tutarlık göstermektedir (Zhang, Li ve Dang, 2016; Jing vd., 2021) (Şekil 5.2.).



Şekil 5.2. Ektoin (solda) ve hipoksantin (sağda)

E. foetida'da varlığını belirlediğimiz bir başka bileşik ise naftalen türevi bir aromatik amin türevi olan 1-naftilamindir. Doğal kökenli bir madde olmayan 1-naftilaminin, kimyasal karsinojen ve herbisit sınıfında bir kimyasal olduğundan, solucanın beslenmesi esnasında topraktan veya mamasından solucana geçmiş bir bileşik olduğu sonucuna varılmıştır.

Literatür tarama çalışmalarımıza göre; *E. foetida*'nın kolinesteraz enzimleri üzerine inhibitör potansiyeline dair bir çalışmaya rastlanmamış, ancak TYR inhibitör etkisi hakkında bir çalışma bildirilmiştir. Bahsi geçen çalışmada, Malezya'da yaşayan *E. foetida*, *Lumbricus rubellus* ve *Eudrilus eugeniae* adlı solucan türleri liyofilize edilmiş ve elastaz, kolajenaz ve TYR inhibitör etkileri açısından 10 mg/mL konsantrasyonda test edilmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre; *E. foetida* referans olarak EGCG (%84,79) kullanılan deney yönteminde elastaza karşı %46,18, referans olarak *N*-izobütil-*N*-(4-metoksifenilsülfonil)-glisilhidroksamik asit (*N*-isobutyl-*N*-(4-methoxyphenylsulfonyl)-glycylhydroxamic acid, NNGH) (%86,18) kullanılan deney yönteminde, kolajenaza karşı %81,42 ve referans olarak L-sistein (%93,51) kullanılan deney yönteminde ise TYR'a karşı %80,12 oranında inhibisyon göstermiştir (Azmi, Hashim, Hashim, Halimoon ve Majid, 2014). Tez çalışmamızda *E. foetida* üzerinde benzer enzim inhibisyon testlerini yürütmemizin de bir sebebi olan bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile tez çalışmamızda elde ettiğimiz TYR ve elastaz inhibisyon bulgularımız farklılık göstermişken, kolajenaza karşı benzer sonuç saptanmıştır. Ancak Malezya kökenli *E. foetida* üzerinde yapılan çalışmada, çok yüksek konsantrasyonda ölçüm yapıldığı dikkate alınmalıdır.

Kolinesteraz inhibitörü olarak klinikte kullanılan ilaçların azot taşıyan moleküller olması sebebiyle, tezimizde solucan EtOH ve katı gübre EtOH ekstresinde tespit edilen azotlu bileşikler olan ektoin ve hipoksantin adlı moleküllerin ekstrenin BChE inhibitör etkisine katkıda bulunabilecekleri düşünülmüştür. Elimizde bileşikler mevcut olmadığından, bu hipotezimizi desteklemek için *in silico* deney ortamında her iki bileşiğin enzim ile etkileşmesi incelenmiştir. X-ışını yapıları mukayese edildiğinde, genel anlamda AChE ve BChE yapılarının benzer olduğu gösterilmekle birlikte, aktif bölgeler ve aktif bölge geçitlerinde birkaç yapısal farklılık tanımlanmıştır (Nicolet, Lockridge, Masson, Fontecilla-Camps ve Nachon, 2003; Dvir, Silman, Harel, Rosenberry ve Sussman, 2010). Her iki enzimin de aktif bölgesinde, serin, histidin ve glutamat katalitik üçlüsünün bir parçası olarak bir serin nükleofiline bulunmakta ve glisin birimlerinden iki amit, bir "oksianyon deliği" içinde substrat karbonil grubu ile hidrojen bağları oluşturmak üzere yerleşik vaziyettedir. Ayrıca iki enzim için aktif bölge boşluklarının boyutu farklıdır ve BChE'nin aktif bölgesi AChE'a göre daha büyüktür. BChE'da, lösin ve izolösin gibi alifatik aminoasitler bulunurken, burada AChE'de karşılık gelen pozisyonlarda iki fenilalanin birimi bulunur. Bulgular kısmında ayrıntılı olarak açıklandığı üzere; ektoinin yapısındaki karboksilik asit grubuna ait karbonil oksijeni ile enzimin oksianyon bölgesinde bulunan

TRP82 ile oluşturduğu hidrojen bağı, PHE329 ile meydana getirdiği π -kasyon etkileşimi ve aktif bölge girişinde PAS aminoasitlerinden ASP70 ile oluşturduğu tuz köprüsü nedeniyle BChE'ı inhibe etme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer bileşik olan hipoksantin ise enzimin aktif bölgesinin katalitik üçlü kısmına ektoine göre daha fazla yanaşmış ve HIS438 ile molekül arasında hidrojen bağının yanı sıra halka ile enzimin oksianyon bölgesini oluşturan TRP82 arasında da π - π etkileşimleri teşekkül etmiştir. Dolayısıyla hipoksantin de BChE'ı inhibe etme ihtimalinin yüksek olduğu tahmin edilmiştir. Diğer yandan, *E. foetida* ekstralarında çoğunlukla bulunduğunu saptadığımız aminoasitlerin kolinesteraz inhibitör etkilerine dair çalışmalar sınırlıdır. Bu nedenle solucanın BChE inhibe edici etkisine aminoasitler gibi primer metabolitlerden ziyade, diğer bileşiklerin etkisi olduğu düşünülebilir.

Mezenkimal kök hücreler (MKH) kendini yenileyebilme ve osteoblast, adiposit, kondrosit ve miyoblastları içeren mezenkim hatlara dönüşebilme özellikleri ile tanımlanmaktadır. Plastik yüzeye tutunabilmeleri ve *in vitro* ekspansiyon yetenekleri sayesinde ilk olarak kemik iliğinden izole ve kültür edilmişlerdir (Friedenstein, Gorskaja ve Kulagina, 1976). Bugün, MKH'ler kordon kanı, karaciğer, kas, beyin, yağ doku ve oromaksillofasiyal kaynaklar; özellikle dental pulpadan elde edilebilmektedir (Hassink vd., 1997; Gronthos, Mankani, Brahim, Robey ve Shi, 2000; Minguell, Erices ve Conget, 2001; Tocci ve Forte, 2003). MKH'ler farklı donörler arasında çok düşük değişiklikler gösteren multipotent prekürsörler olmasına karşılık (Pittenger vd., 1999), farklı dokulardan elde edilen MKH'lerin birbirleri arasında değişen özellikleri halen belirsiz olup araştırma konusudur (Kang vd., 2016; Abbas vd., 2018; Angelopoulos, Brizuela ve Khoury, 2018; Kunimatsu vd., 2018; Mendi vd., 2018). Buna karşılık, MKH transplantasyonu rejeneratif tıpta doku hasarlarının tedavisinde en çok umut vaat eden kök hücre temelli stratejilerdendir (Caplan, 2007). Mezenkimin değişen hatlarına farklılaşabilme özelliğinin dışında MKH'ler, hasarlı dokuya yönelebilmeleri ve sekretomları olan immünsüpresif moleküller ve gelişme faktörleri salgılayarak immün homeostasisi düzenlemekte ve doku onarımını kolaylaştırma özellikleri sayesinde, rejeneratif tıp klinik uygulamalarında tercih edilmektedir (Ma, Xie, Li, Yuan, Shi ve Wang, 2014). Uygulama yapılan hastalıklar, hematolojik bozukluklar, hepatit, immün sistem bozuklukları, Chron's hastalığı, enflamatuvar bağırsak sendromu, göz hasarları, spinal kord yaralanmaları, Alzheimer ve Parkinson hastalığı ile şizofreni hastalarında klinik uygulamalar gerçekleştirilmiştir. *E. foetida*'nın kendini yenileyebilme

(rejenerasyon) özelliği dikkatimizi çekmiş ve bizi nöral krest kökenli dental pulpa mezenkim kök hücreleri üzerindeki etkisinin araştırılmasına yönlendirmiştir. Literatür taramalarımıza göre; prekondisyon çalışmaları genellikle kemik iliği kaynaklı MKH'ler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Dental pulpa MKH'leri üzerinde gerçekleştirilen çalışmalara ise rastlanmamıştır. Tez çalışmamızda, *E. foetida* solucan EtOH ekstresi ve sıvı gübre liyofilizatının nöral krest kökenli dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin (DP-MKH) kemikleşme ve farklılaşmasındaki rolü ile ekstraselüler matriks komponentlerine etkisi araştırılmıştır. Kemikleşme erken işareti ON ve geç kemikleşme işareti olan OCN, kültür supernatantlarından 21. günde alınan örneklerde araştırılmıştır. ON farklılaşmanın 14. gününden kültür supernatantında en yüksek seviyeye ulaşmakta ve stabilitesi az olduğu için 21. günde azalmaktadır. OST 4,14 grubunda ise ON miktarı en az olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç farklılaşmanın erken başladığı olarak yorumlanabilir. OCN'nin ise farklılaşmada 14. günden itibaren oluşmaya başladığı saptanmış ve OST-4,14 grubunda en yüksek seviyede tespit edilmiştir. Kök hücre çalışmalarımızın genel sonucu olarak; *E. foetida* EtOH ekstresi aralıklı olarak kullanıldığı zaman DP-MKH osteojenik farklılaşması ve kemikleşmeyi uyarmaktadır. Kemikleşme; proliferasyonun artması, farklılaşma ve kalsiyum granüllerinin oluşması aşamalarından meydana gelmektedir. Bu nedenle *E. foetida*'nın aralıklı olarak kullanıldığında, proliferasyonu arttırması, kolajen miktarını yükseltmesi ve kalsiyum granüllerinin oluşumunu tetiklemesi şeklinde bir mekanizma üzerinden farklılaşmayı arttırdığı sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, tez çalışmamız özellikle ülkemizde Farmakognozinin nispeten ihmal edilmiş bir doğal kaynak olan hayvansal türlerden üzerinde yapılmış olan ilk çalışmalardan birini ve ülkemizde kültürü yapılan *E. foetida*'dan hareketle yapılmış Farmakognozi disiplini kapsamında yapılmış ilk çalışmayı teşkil etmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

“*Eisenia foetida* (Savigny) Adlı Solucan Türüne Ait Ekstrelerin Enzim İnhibitör Etkileri Yönünden İncelenmesi” adlı doktora tez çalışmamızda, hayvansal bir tür olarak *E. foetida* adlı solucan türü bireyleri ile katı gübresinden hareketle elde edilen DKM, EtOAc ve EtOH ekstralarının yanısıra liyofilize edilmiş sıvı gübresinin AChE, BChE, TYR, KO, elastaz ve kolajenaz olmak üzere 6 adet enzime karşı inhibitör kapasiteleri incelenmiştir. Ayrıca solucanların rejenerasyon özelliği dikkate alınarak, ekstraların nöral krest kökenli dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin (DP-MKH) kemikleşme ve farklılaşmasındaki rolü ile ekstraselüler matriks komponentlerine etkisi incelenmiştir. Bulgularımıza ve daha önce *E. foetida* üzerinde yapılan çalışmalara dayanarak, *E. foetida* solucan ekstresi veya solöm sıvısının doğal hammadde olarak yara iyileştirici etkisine yönelik ürün geliştirilmesi önerilebilir. Bu verimizden hareketle, tez çalışmalarımız devam ederken 2019 yılında Gazi Üniversitesi Buluş Komisyonu “Kırmızı Kaliforniya Solucan Ekstresi ve Kullanımı” adlı Türk Patent ve Marka Kurumuna yapılacak başvurumuz hakkında bilgilendirilmiş ve Buluş Komisyonu kararıyla Üniversitemizin %100 hak sahipliğini üstendiği bahsi geçen patent başvurusu 26.12.2019 tarihinde Türk Patent ve Marka Kurumuna yapılmıştır (Ek-1). Ayrıca 2019 yılında Ankara Kalkınma Ajansı tarafından yurt çapında düzenlenen proje yarışmasında, “Kırmızı Kaliforniya Solucanı – Kozmetik Ürün ve Diş Sağlığında Yeni Bir Doğal Hammadde” başlıklı projemiz, sergilenmeye değer ilk 100 proje arasına girmiştir (Ek-2).

E. foetida doğal bir hammadde olarak kullanılarak prototip ürün geliştirmeye yönelik çalışmalarımız tez sonrasında da devam edecektir. Tez çalışmamız, bitkisel kaynakların yanı sıra hayvansal kaynakların da Farmakognozi açısından muhakkak araştırılması gerektiğine bir kez daha işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbas, O. L., Özatik, O., Gönen, Z. B., Özatik, F. Y., Salkın, H. ve Musmul, A. (2018). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and dental pulp as sources of cell therapy for xone of stasis burns. *Journal of Investigative Surgery*, 14, 1-4.
- Amarpal, Singh, R. V., Aithal, H. P., Kinjavdekar, P., Pawde, A. M., Singh, K. P., and Gugjoo, M. B. (2015). Evaluation of the healing potential of earthworm coelomic fluid in full thickness skin wounds in rabbits. *Veterinarski Arhiv*, 85(2), 189-200.
- Andleeb, S., Ejaz, M., Awan, U. A., Ali, S., Kiyani, A., Shafique, I., and Zafar, A. (2016). *In vitro* screening of mucus and solvent extracts of *Eisenia foetida* against human bacterial and fungal pathogens. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(3), 969-977.
- Angelopoulos, I., Brizuela, C., and Khoury, M. (2018). Gingival mesenchymal stem cells outperform haploidentical dental pulp derived mesenchymal stem cells in proliferation rate, migration ability, and angiogenic potential. *Cell Transplantation*, 27, 967-978.
- Ansari, A. A., Sitaram, K. (2011). An investigation into the antimicrobial and antifungal properties of earthworm powder obtained from *Eisenia fetida*. *American Journal of Food Technology*, 6(4), 329-335.
- Augustine, D., Rao, R. S., Anbu, J., and Chidambara Murthy, K. N. (2017). *In vitro* antiproliferative effect of earthworm coelomic fluid of *Eudrilus eugeniae*, *Eisenia foetida*, and *Perionyx excavatus* on squamous cell carcinoma-9 cell line: a pilot study. *Pharmacognosy Research*, 9, S61-66.
- Azmi, N., Hashim, P., Hashim, D.M., Halimoon, N., and Majid, N.M.N. (2014). Anti-elastase, anti-tyrosinase and matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity of earthworm extracts as potential new anti-aging agent. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4 (Suppl 1), S348-S352.
- Bae, Y.S., Kim, J., Yi, J., Park, S.C., Lee, H.Y., and Cho, S.J. (2020). Characterization of *Perionyx excavatus* development and its head regeneration. *Biology (Basel)*, 9(9), article no: 273.
- Barros, L., Baptista, P., and Ferreira, I. C. (2007). Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food and Chemical Toxicology*, 45(9), 1731-1737.
- Barrantes, E., Guinea, M. (2003). Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and aloe gel. *Life Sciences*, 72(7), 843-850.
- Bergmann, W., Feeney, R. J. (1950). The isolation of a new thymine pentoside from sponges. *Journal of American Chemical Society*, 72, 2809-2810.

- Bergmann, W., Feeney, R.J. (1951). Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. *Journal of Organic Chemistry*, 16, 981-987.
- Beschin, A., Bilej, M., Hanssens, F., Raymakers, J., Van Dyck, E., Revets, H., Brys, L., Gomez, J., De Bateselier, P., and Timmermans, M. (1998). Identification and cloning of a glucan- and lipopolysaccharide-binding protein from *Eisenia foetida* earthworm involved in the activation of prophenoloxidase cascade. *Journal of Biological Chemistry*, 273(38), 24948-24954.
- Bieger, D., Hornykiewicz, O. (1972). Dopamine in the earthworm, *Lumbricus terrestris*: enhancement of rhythmic contractile activity. *Neuropharmacology*, 11(5), 745-748.
- Bilej, M., Brys, L., Beschin, A., Lucas, R., Vercauteren, E., Hanusova, R., and De Baetselier, P. (1995). Identification of a cytolytic protein in the coelomic fluid of *Eisenia foetida* earthworms. *Immunology Letters*, 45, 123-128.
- Bilej, M., De Baetselier, P., Van Dijck, E., Stijlemans, B., Colige, A., and Beschin, A. (2001). Distinct carbohydrate recognition domains of an invertebrate defense molecule recognize Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 45840-45847.
- Bilej, M., Rossmann, P., Sinkora, M., Hanusova, R., Beschin, A., Raes, G., and De Baetselier, P. (1998). Cellular expression of the cytolytic factor in earthworms *Eisenia foetida*. *Immunology Letters*, 60, 23-29.
- Bilej, M., Tuckova, L., and Romanowski, A. (1995). Characterization of the limited specificity of antigen recognition in earthworms. *Folia Microbiologica*, 40(4), 436-440.
- Bilstein, A., Heinrich, A., Rybachuk, A., and Mösges, R. (2021). Ectoine in the treatment of irritations and inflammations of the eye surface. *Biomedical Research International*, 2021, article no: 8885032.
- Bisset, N. G. (1991). One man's poison, another man's medicine? *Journal of Ethnopharmacology*, 32, 71-81.
- Borah, M.P., Prasad, S.B. (2017). Ethnozoological study of animals based medicine used by traditional healers and indigenous inhabitants in the adjoining areas of Gibbon Wildlife Sanctuary, Assam, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 13, article no: 39.
- Bou-Maroun, E., Cayot, N. (2011). Odour-active compounds of an *Eisenia foetida* protein powder. Identification and effect of delipidation on the odour profile. *Food Chemistry*, 124, 889-894.
- Bownik, A., Stepniewska, Z. (2016). Ectoine as a promising protective agent in humans and animals. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 67(4), 260-265.
- Bristowe, H. S. (1932). Insects and other invertebrates for human consumption in Siam. *Transitional Entological Sociology*, 80, 387-404.

- Brus, B., Kosak, U., Turk, S., Pisljar, A., Coquelle, N., Kos, J., Stojan, J., Colletier, J.P., and Gobec, S. (2014). Discovery, biological evaluation, and crystal structure of a novel nanomolar selective butyrylcholinesterase inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, *57*, 8167-8179.
- Caplan, A.I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering *versus* regenerative medicine. *Journal of Cell Physiology*, *213*, 341-347.
- Carr, L. G. K. (1951). Interesting animal foods, medicines and omens of the eastern Indians, with comparisons to ancient European practices. *Journal of the Washington Academy of Sciences*, *41*, 229-235.
- Chen, S. H., Cao, M. J., Su, W. J., and Wu, G. P. (2011). Purification and characterization of a novel leucine aminopeptidase from the earthworm *Eisenia foetida*. *Process Biochemistry*, *46*, 1641-1648.
- Chen, H., Takahashi, S., Imamura, M., Okutani, E., Zhang, Z. G., Chayama, K., and Chen, B. A. (2007). Earthworm fibrinolytic enzyme: anti-tumor activity on human hepatoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Chinese Medicine Journal*, *120*(10), 898-904.
- Chen, W.C., Yuan, F.W., Wang, L.F., Chien, C.C., and Wei, Y.H. (2020). Ectoine production with indigenous *Marinococcus* sp. MAR2 isolated from the marine environment. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *50*(1), 74-81.
- Cooper, E. L., Balamurugan, M., Huang, C. Y., Tsao, C. R., Heredia, J., Tommaseo-Ponzetta, M., and Paoletti, M. G. (2012). Earthworms dilong: ancient, inexpensive, noncontroversial models may help clarify approaches to integrated medicine emphasizing neuroimmune systems. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2012*, article no: 164152.
- Cooper, E. L., Hrženjak, T., and Grdiša, M. (2004). Alternative sources of fibrinolytic, anticoagulative, antimicrobial and anticancer molecules. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, *17*, 237-244.
- Cooper E. L., Ru, B., and Weng, N. (2004). Earthworms: sources of antimicrobial and anticancer molecules. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *546*, 359-89.
- Costa-Neto, E. M. (2005). Animal-based medicines: biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *77*(1), 33-43.
- Czurylo, E. A., Kulikova, N., and Sobota, A. (2008). Disturbance of smooth muscle regulatory function by *Eisenia foetida* toxin lysenin: insight into the mechanism of smooth muscle contraction. *Toxicon*, *51*, 1090-1102.
- Ding, S., Lin, X., and He, S. (2019). Earthworms: a source of protein. *Journal of Food Science and Engineering*, *9*, 159-170.

- Dong, G. Q., Yuan, X., L., Shan, Y. J., Zhao, Z. H., Chen, J. P., and Cong, Y. W. (2004). Molecular cloning and characterization of cDNA encoding fibrinolytic enzyme-3 from earthworm *Eisenia foetida*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 36(4), 303-308.
- Drumond, M.A., Guimarães, A.Q., and da Silva, R.H. (2015). The role of local knowledge and traditional extraction practices in the management of giant earthworms in Brazil. *Plos One*, 10(4), article no: e0123913.
- Du Pasquier, L., Duprat, P. (1968). Humoral and cellular aspects of a non-specific natural immunity in the oligochetee *Eisenia foetida* Sav (Lumbricinae). *Comptes Rendus de l'Académie Sciences- Hebdomadaires des Séances*, 266(5), 538-541.
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T.L., and Sussman, J.L. (2010). Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*, 187(1-3), 10-22.
- Edwards, C. A., Bohlen, P. J. (1996). *Biology and Ecology of Earthworms*, (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., and Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Erdoğan Orhan, İ. (2014). Pharmacognosy: science of natural products in drug discovery. *Bioimpacts*, 4(3), 109-110.
- Fadaee, R. (2012). A review on earthworm *Eisenia fetida* and its applications. *Annals of Biological Research*, 3(5), 2500-2506.
- Fatollahi, P., Ghasemi, M., Yazdian, F., and Sadeghi, A. (2021). Ectoine production in bioreactor by *Halomonas elongata* DSM2581: using MWCNT and Fe-nanoparticle. *Biotechnological Progress*, 37(1), article no: e3073.
- Fenzia, S., Thume, K., Wirgenings, M., and Pohnert, G. (2020). Ectoine from bacterial and algal origin is a compatible solute in microalgae. *Marine Drugs*, 18(1), article no: 42.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology*, 4, 267-274.
- Friesner, R.A., Murphy, R.B., Repasky, M.P., Frye, L.L., Greenwood, J.R., Halgren, T.A., Sanschagrin, P.C., and Mainz, D.T. (2006). Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 6177-6196.
- Furman, B. L. (2012). The development of Byetta (exenatide) from the venom of the Gila monster as an anti-diabetic agent. *Toxicon*, 59(4), 464-471.

- Garg V.K., Chand, S., Chhillar, A., and Yadav, A. (2005). Growth and reproduction of *Eisenia foetida* in various animal wastes during vermicomposting. *Applied Ecology and Environmental Research*, 3, 51-59.
- Gates, G. E. (1926). The earthworms of Rangoon. *Journal of the Burma Research Society*, 25, 196-221.
- Goodarzi, G., Qujeq, D., Elmi, M. M., Feizi, F., and Fathai, S. (2016). The effect of the glycolipoprotein extract (G-90) from earthworm *Eisenia foetida* on the wound healing process in alloxan-induced diabetic rats. *Cell Biochemistry and Function*, 34, 242-249.
- Gopi Daisy, N., Subramanian, E.R., Selvan Christyraj, J.D., Sudalai Mani, D.K., Selvan Christyraj, J.R., Ramamoorthy, K., Arumugaswami, V., and Sivasubramaniam, S. (2016). Studies on regeneration of central nervous system and social ability of the earthworm *Eudrilus eugeniae*. *Invertebrate Neuroscience*, 16(3), article no: 6.
- Grdiša, M., Mikecin, A. M., and Knežević, N. (2009). Fibrinolytic enzymes from earthworms. *Dynamic Soil, Dynamic Plant*, 3(Special Issue 2), 61-63.
- Grdisa, M., Hrzenjak, T. (2007). Glycolipoprotein extract of *Eisenia foetida* (G-90): a source of biological active molecules. *European Journal of Soil Biology*, 43, S104-S109.
- Grdiša, M., Popovic, M., and Hrzenjak, T. (2001). Glycolipoprotein extract G-90 from earthworm *Eisenia foetida* exerts some antioxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 128, 821-825.
- Griffith, C.M., Williams, P.B., Tinoco, L.W., Dinges, M.M., Wang, Y., and Larive, C.K. (2017). ¹H NMR metabolic profiling of earthworm (*Eisenia foetida*) coelomic fluid, coelomocytes, and tissue: identification of a new metabolite-malylglutamate. *Journal of Proteome Research*, 16(9), 3407-3418.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P.G., and Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 97, 13625-13630.
- Gruber, C., Stürzenbaum, S., Gehrig, P., Sack, R., Hunziker, P., Berger, B., and Dallinger, R. (2000). Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein. (Cd)-metallothionein from *Eisenia foetida*. *European Journal of Biochemistry*, 267(2), 573-582.
- Gunadi, B., Edwards, C. A. (2003). The effect of multiple applications of different organic wastes on the growth, fecundity and survival of *Eisenia foetida* (Savigny) (Lumbricidae). *Pedobiologia*, 47(4), 321-329.
- Haggag, G. M., Khalaf-El-Duweini, A. (1958). Detection of uric acid in the tissue homogenates of earthworms. *Nature*, 181(4603), 191-192.

- Hanusova, R., Bilej, M., Brys, L., De-Baetselier, P., and Beschin, A. (1999). Identification of a coelomic mitogenic factor in *Eisenia foetida* earthworm. *Immunology Letters*, *65*, 203-211.
- Haruta, K., Kobayashi, S., Tajima, M., Yui, R., Tamura, N., Nagaoka, I., and Hashimoto, H. (2002). Lysenin, a sphingomyelin-binding protein: its role in the activation of platelets. *Biomedical Research*, *23*(3), 153-159.
- Hassink, S.G., de Lancey, E., Sheslow, D.V., Smith-Kirwin, S.M., O'Connor, D.M., Considine, R.V., Opentanova, I., Dostal, K., Spear, M.L., Leef, K., Ash, M., Spitzer, A.R., and Funanage, V.L. (1997). Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development? *Pediatrics*, *100*, 11-16.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., and Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *36*(6), 2090-2097.
- Heredia, R.B., Dueñas, S., Castillo, L., Ventura, J.J., Silva Briano, M., Posadas del Rio, F., and Rodríguez, M.G. (2008). Autofluorescence as a tool to study mucus secretion in *Eisenia foetida*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, *151*, 407-414.
- Hrzenjak, T., Hrzenjak, M., Kasuba, V., Efenberger Marinculic, P., and Levanat, S. (1992). A new source of biologically active compounds: earthworm tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, *102*(3), 441-447.
- Hrzenjak, T., Popovic, M., Bozic, T., Grdisa, M., Kobrehel, D., and Tiska-Rudman, L. (1998b). Fibrinolytic and anticoagulative activities from the earthworm *Eisenia foetida*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, *119*, 825-832.
- Hrzenjak, T., Popovic, M., and Tiska-Rudman, L. (1998a). Fibrinolytic activity of earthworms extract (G-90) on lysis of fibrin clots originated from the venous blood of patients with malignant tumors. *Pathology Oncology Research*, *4*(3), 206-211.
- Hua, Z., Wang, Y. H., Cao, H. W., Pu, L. J., and Cui, Y. D. (2011). Purification of a protein from coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* and evaluation of its hemolytic, antibacterial, and antitumor activities. *Pharmaceutical Biology*, *49*(3), 269-275.
- Hughes, F.M., Côrtes-Figueira, J.E., and Drumond, M.A. (2019). Anticipating the response of the Brazilian giant earthworm (*Rhinodrilus alatus*) to climate change: implications for its traditional use. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *91*(1), article no: e20180308.
- Ito, M., Abe, S., Sekizawa, Y., and Kobayashi, H. (1997). Lethal effects of lysenin, a novel protein isolated from the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*, on the spermatozoa of the African clawed frog and the mouse. *Biomedical Research*, *18*(6), 399-404.

- Jamshidzadeh, A., Heidari, R., Golzar, T., and Derakhshanfar, A. (2016). Effect of *Eisenia foetida* extract against cisplatin-induced kidney injury in rats. *Journal of Dietary Supplements*, 13(5), 551-559.
- Jing, N., Wang, X., Yang, X., Liu, Q., Wang, H., Dong, F., He, K., and Wang, N. (2021). Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of complex compounds in serum and its application in accurate detection of early arsenic exposure. *ACS Omega*, 6, 28326-28333.
- Kalaç, Y. (1997). *Dendrobaena venata (Oligochaeta lumbricidae)'da Bakteri Enfeksiyonuna Hücresel ve Humoral Yanıt*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 25-69.
- Kang, C.M., Kim, H., Song, J.S., Choi, R.J., Kim, S.O., Jung, H.S., Moon, S.J., and Choi, H.J. (2016). Genetic comparison of stemness of human umbilical cord and dental pulp. *Stem Cells International*, 2016, article no: 3453890.
- Khan, S. B., Afza, N., Malik, A., Azhar-Ul-Haq, Perveen, S., Ahmad, I., and Iqbal Choudhary, M. (2006). Xanthine oxidase inhibiting flavonol glycoside from *Amberboa ramosa*. *Natural Product Research*, 20(4), 335-339.
- Kobayashi, H., Ohta, N., and Umeda, M. (2004). Biology of lysenin, a protein in the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *International Review of Cytology*, 236, 45-99.
- Kobayashi, H., Sekizawa, Y., Aizu, M., and Umeda, M. (2000). Lethal and non-lethal responses of spermatozoa from a wide variety of vertebrates and invertebrates to lysenin, a protein from the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *Journal of Experimental Zoology*, 286, 538-549.
- Kobayashi, H., Sekizawa, Y., Shioda, S., Natori, S., Nakajima, T., and Umeda, M. (1997). Lysenin, a novel bioactive protein isolated from coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*-structure, secretion and biological activity. In: Korf HW, Usadel KH, eds. Neuroendocrinology: retrospect and perspectives. Berlin/New York: Springer, 255-265.
- Koenig, S., Wagner, F., Kauschke, E., Peter-Katalinic, J., and Cooper, E. L., and Eue, I. (2003). Mass spectrometric analyses of CL (39), CL (41) and H (1), H (2), H (3) confirm identity with fetidin and lysenin produced by earthworm leukocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 27 (6-7), 513-520.
- Kolesnyk, N., Simon, M., Marenkov, O., and Sharamok, T. (2018). Red Californian earthworm (*Eisenia foetida* Andrei) as a valuable food item in fish farming. *Ribogospodars'ka Nauka Ukraini*, 4(46), 26-48.
- Kostecka, J. (2000). Badania nad wermikom- postowaniem odpadów organicznych. *Zeszyty Naukowe AR w Krakowie Rozprawy*, 268, 1-88.
- Kraunsoe, J. A., Claridge, T. D., and Lowe, G. (1996). Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, 35(28), 9090-9096.

- Kruk, J., Dziurka, M., and Płytycz, B. (2019). Identification of new fluorophores in coelomic fluid of *Eisenia andrei* earthworms. *Plos One*, 2019, 1-10.
- Kunimatsu, R., Nakajima, K., Awada, T., Tsuka, Y., Abe, T., Ando, K., Hiraki, T., Kimura, A., and Tanimoto, K. (2018). Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*, 501(1), 193-198.
- Kunin, W. E., Lawton, J. H. (1996). Does biodiversity matter? Evaluating the case for conserving species. In: Gaston, K. J. (Ed.), *Biodiversity: a biology of numbers and differences*, Oxford: Blackwell Science: 283-308.
- Kuo, Y.J., Chung, C.H., and Huang, T.F. (2019). From discovery of snake venom disintegrins to a safer therapeutic antithrombotic agent. *Toxins (Basel)*, 11(7), article no: 372.
- Kwiatkowska, K., Hordejuk, R., Szymczyk, P., Kulma, M., Abdel-Shakor, A.B., Plucienniczak, A., Dolowy, K., Szewczyk, A., and Sobota, A. (2007). Lysenin-His, a sphingomyelin-recognizing toxin, requires tryptophan 20 for cation-selective channel assembly but not for membrane binding. *Molecular Membrane Biology*, 24(2), 121-134.
- Lassalle, F., Lassègues, M., and Roch, P. (1993). Serological evidence and amino acid sequence of ubiquitin-like protein isolated from coelomic fluid and cells of the earthworm *Eisenia fetida* Andrei. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 104(3), 623-628.
- Laulan, A., Morel, A., Lestage, J., Delaage, M., and Châteaureynaud-Duprat, P. (1985). Evidence of synthesis by *Lumbricus terrestris* of specific substances in response to an immunization with a synthetic hapten. *Immunology*, 56, 751-758.
- Li, C., Chen, M., Li, X., Yang, M., Wang, Y., and Yang, X. (2017). Purification and function of two analgesic and anti-inflammatory peptides from coelomic fluid of the earthworm, *Eisenia foetida*. *Peptides*, 89, 71-81.
- Liu, C. M., Chen, X. T., Pan, Y. Y., Liang, H., Song, S. L., and Ji, A. G. (2017). Antitumor studies of earthworm fibrinolytic enzyme component A from *Eisenia foetida* on breast cancer cell line MCF-7. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79(3), 361-368.
- Liu, Y. Q., Sun, Z. J., Wang, C., Li, S. J., and Liu, Y. Z. (2004). Purification of a novel antibacterial short peptide in earthworm *Eisenia foetida*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 36(4), 297-302.
- Loko, L.E.Y., Fagla, S.M., Orobiyi, A., Glinma, B., Toffa, J., Koukoui, O., Djogbenou, L., and Gbaguid, F. (2019). Traditional knowledge of invertebrates used for medicine and magical-religious purposes by traditional healers and indigenous populations in the Plateau Department, Republic of Benin. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 15, article no: 66.

- Lucas, R., Magez, S., De Leys, R., Fransen, L., Scheerlinck, J. P., Rampelberg, M., Sablon, E., and De Baetselier, P. (1994). Mapping the lectin-like activity of tumor necrosis factor. *Science*, 263(5148), 814-817.
- Luo, W., Deng, Z.H., Li, R., Cheng, G., Kotian, R.N., Li, Y.S., and Li, W.P. (2018). Study of analgesic effect of earthworm extract. *Bioscience Reports*, 38(1), article no: BSR20171554.
- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., and Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 21(2), 216-225.
- MacCord, K., Maienschein, J. (2019). Understanding regeneration at different scales. *Elife*, 8, article no: e46569.
- Magez, S., Geuskens, M., Beschin, A., del Favero, H., Verschueren, H., Lucas, R., Pays, E., and De Baetselier, P. (1997). Specific uptake of tumor necrosis factor-alpha is involved in growth control of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cellular Biology*, 137(3), 715-727.
- Masamoto, Y., Ando, H., Murata, Y., Shimoishi, Y., Tada, M., and Takahata, K. (2003). Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculetin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(3), 631-634.
- Marques, J. G. W. (1997). Fauna medicinal: recurso do ambiente ou ameaça à biodiversidade? *Mutum*, 1(1), article no: 4.
- Matausic-Pisl, M., Tomičić, M., Micek, V., and Grdisa, M. (2011). Tissue extract from *Eisenia foetida* as a wound-healing agent. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15, 71-78.
- Medina, A. L., Cova, J. A., Vielma, R. A., Pujic, P., Carlos, M. P., and Torres, J. V. (2003). Immunological and chemical analysis of proteins from *Eisenia foetida* earthworm. *Food and Agricultural Immunology*, 15 (3-4), 255-263.
- Mendi, A., Gökçınar Yağcı, B., Sarac, N., Kızıloğlu, M., Uğur, A., Uçkan, D. ve Yılmaz, D. (2018). Niche differs the effects of *Hypericum perforatum* L. on the dental pulp- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells proliferation, osteogenic differentiation, and inflammatory response. *Cells Tissues and Organisms*, 205, 208-216.
- Minakata, H., Ikeda, T., Nagahama, T., Oumi, T., Ukena, K., Matsushima, O., Kawano, T., and Kimura, Y. (1999). Comparison of precursor structures of the GGNG peptides derived from the earthworm *Eisenia foetida* and the leech *Hirudo nipponia*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 63(2), 443-445.
- Minguell, J.J., Erices, A., and Conget, P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 226(6), 507-520.
- Moon, B. C., Kim, J. S. (2018). The potential of earthworm and its components as a therapeutic agent for neuronal damage. *Journal of Biomedical and Translational Research*, 19(3), 58-64.

- Moreno, A. G., Paoletti, M. G. (2004). *Andiorrhinuskuru* sp. nov. (Oligochaeta: Glossoscolecidae), a giant earthworm as food resource for Makiritare Indians of the Alto Rio Padamo, Amazonas, Venezuela. *Canadian Journal of Zoology*, 82(6), 1000-1004.
- Müller, M.C. (2004). Nerve development, growth and differentiation during regeneration in *Enchytraeus fragmentosus* and *Stylaria lacustris* (Oligochaeta). *Development Growth & Differentiation*, 46(5), 471-478.
- Nakajima, N., Sugimoto, M., and Ishihara, K. (2000). Stable earthworm serine proteases: application of the protease function and usefulness of the earthworm autohydrolyzate. *Biotechnology and Bioengineering*, 90, 174-179.
- Nicolet, Y., Lockridge, O., Masson, P., Fontecilla-Camps, J.C., and Nachon, F. (2003). Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41141-41147.
- Niida, T., Nagahama, T., Oumi, T., Ukena, K., Morishita, F., Furukawa, Y., Matsushima, O., Tsutsui, K., Ohtani, M., Muneoka, Y., Fujita, T., Kawano, T., Minakata, H., and Nomoto, K. (1997). Characterization of binding of the annelidan myoactive peptides, GGNG Peptides, to tissues of the earthworm, *Eisenia foetida*. *The Journal of Experimental Zoology*, 279, 562-570.
- Ohta, N., Wake, K., and Kobayashi, H. (2002). Respiratory difficulties in mice treated with lysenin, a protein purified from the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *Biomedical Research*, 23(4), 131-185.
- Olivares Fontt, E. O., De Baetselier, P., Heirman, C., Thielemans, K., Lucas, R., and Vray, B. (1998). Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Infection and Immunity*, 66(6), 2722-2727.
- Oumi, T., Ukena, K., Matsushima, O., Ikeda, T., Fujita, T., Minakata, H., and Nomoto, K. (1995). The GGNG peptides: novel myoactive peptides isolated from the gut and the whole body of the earthworms. *Biochemistry Biophysics Research Communications*, 216, 1072-1078.
- Pan, R., Zhou, Y., He, H. J., and He, R. Q. (2011). An enzyme from the earthworm *Eisenia fetida* is not only a protease but also a deoxyribonuclease. *Biochemistry Biophysics Research Communications*, 407(1), 113-117.
- Paoletti, M. G., Buscardo, E., VanderJagt, D. J., Pastuszyn, A., Pizzoferrato, L., Huang, Y. S., Chuang, L. T., Millson, M., Cerda, H., Torres, F., and Glew, R. H. (2003). Nutrient content of earthworms consumed by Ye'Kuana Amerindians of the Alto Orinoco of Venezuela. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 249-257.
- Paoletti, M. G., Dufour, D. L. (2005). Edible invertebrates among Amazonian Indians: a critical review of Disappearing Knowledge, in *Ecological Implications of Minelivestock*, Science Publishers, Enfield, NH, USA: 293-342.

- Parkes, D. G., Mace, K. F., and Trautmann, M. E. (2013). Discovery and development of exenatide: the first antidiabetic agent to leverage the multiple benefits of the incretin hormone, GLP-1. *Expert Opinion in Drug Discovery*, 8(2), 219-244.
- Parwata, I.P., Wahyuningrum, D., Suhandono, S., and Hertadi, R. (2019). Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*: optimization using response surface methodology. *International Journal of Microbiology*, 2019, article no: 5475361.
- Perrier, E. (1872). *Recherches pour servir a l'histoire des Lombriciens terrestres*. Bouvier.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147.
- Podolak, A., Kostecka, J., Mazur-Pączka, A., Garczyńska, M., Pączka, G., and Szura, R. (2020). Life cycle of the *Eisenia fetida* and *Dendrobaena veneta* earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae). *Journal of Ecological Engineering*, 21(1), 40-45.
- Popović, M., Grdiša, M., and Hrženjak, T. M. (2005). Glycolipoprotein G-90 obtained from the earthworm *Eisenia foetida* exerts antibacterial activity. *Veterinarski Arhiv*, 75(2), 119-128.
- Popovic, M., Hrzenjak, T., Grdisa, M., and Vukovic, S. (1998). Adhesins of immunoglobulin-like superfamily from earthworm *Eisenia foetida*. *General Pharmacology*, 30(5), 795-800.
- Prabha, M. L., Jayaraaj, I. A., Jeyaraaj, R., and Rao, S. (2007). Comparative studies on the digestive enzymes in the gut of earthworms, *Eudrilus eugeniae* and *Eisenia fetida*. *Indian Journal of Biotechnology*, 6, 567-569.
- Rault, M., Mazzia, C., and Capowiez, Y. (2007). Tissue distribution and characterization of cholinesterase activity in six earthworm species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemical and Molecular Biology*, 147(2), 340-346.
- Rejnek, J., Tuckova, L., Zikan, J., and Tomana, M. (1991). The interaction of a protein from the coelomic fluid of earthworm with staphylococcal protein A. *Development & Comparative Immunology*, 15, 269-278.
- Reinecke, A. J., Viljoen, S. A. (1991). A comparison of the biology of *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Biology and Fertility of Soils*, 11, 295-230.
- Reynolds J. W., Reynolds, W. M. (1972). Earthworms in medicine. *American Journal of Nursing*, 72(7), 1273-1279.
- Righi, G., Araujo, Y. (1999). *Andiorrhinus (Amazonidrilus) motto* n. sp. and *Rhinodrilus appuni pavoni* n. subsp. (Oligochaeta, Glossoscolecidae) from the Venezuelan Amazonia. *Miscellanea Zoològica*, 22(1), 93-100.
- Roch, P. (1984). Isolation of agglutinins and lysins from earthworm coelomic fluid by gel filtration followed by chromatofocussing. *Journal of Chromatography*, 290, 231-235.

- Roch, P., Valembois, P., Davant, N., and Lassegues, M. (1981). Protein analysis of earthworm coelomic fluid II. Isolation and biochemical characterization of the *Eisenia foetida* Andrei factor (EFAF). *Comparative and Biochemical Physiology*, 69B, 829-836.
- Roch, P., Valembois, P., and Lassegues, M. (1987). Genetic and biochemical polymorphism of earthworm humoral defenses. *Progress in Clinical and Biological Research*, 233, 91-102.
- Royuela, M., Astier, C., Fraile, B., and Paniagua, R. (1999). Actinin in different invertebrate muscle cell types of *Drosophila melanogaster*, the earthworm *Eisenia foetida*, and the snail *Helix aspersa*. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 20, 1-9.
- Royuela, M., Garcia-Anchuelo, R., De Miguel, M. P., Arenas, M. I., Fraile, M., and Paniagua, R. (1996). Immunocytochemical electron microscopic study and western blot analysis of troponin in striated muscle of the fruit fly *Drosophila melanogaster* and in several muscle cell types of the earthworm *Eisenia foetida*. *The Anatomical Record*, 244, 148-154.
- Sangwan P., Kaushik C.P., and Garg V.K. (2008). Feasibility of utilization of horse dung spiked filter cake in vermicomposters using exotic earthworm *Eisenia foetida*. *Bioresource Technology*, 99, 2442-2448.
- Schenk, S. and Hoeger, U. (2020). Annelid coelomic fluid proteins. *Subcellular Biochemistry*, 94, 1-34.
- Sekizawa, Y., Hagiwara, K., Nakajimaz, T., and Kobayashi, H. (1996). A novel protein, lysenin, that causes contraction of the isolated rat aorta: its purification from the coelomic fluid of the earthworm, *Eisenia foetida*. *Biomedical Research*, 17(3), 197-203.
- Sekizawa, Y., Kubo, T., Kobayashi, H., Nakajima, T., and Natori, S. (1997). Molecular cloning of cDNA for lysenin, a novel protein in the earthworm *Eisenia foetida* that causes contraction of rat vascular smooth muscle. *Gene*, 191(1), 97-102.
- Sekizawa, Y., Ohta, N., Natori, S., and Kobayashi, H. (1996). Immunocytochemical localization of lysenin, a novel protein isolated from the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *Biomedical Research*, 17(4), 327-330.
- Shakor, A.B., Czurylo, E.A., and Sobota, A. (2003). Lysenin, a unique sphingomyelin-binding protein. *FEBS Letters*, 542, 1-6.
- Shen, Y. (2010). Earthworms in traditional Chinese medicine. *Zoology in the Middle East*, 51(Sup. 2), 171-173.
- Silerova, M., Prochazkova, P., Joskova, R., Josens, G., Beschin, A., De Baetselier, P., and Bilej, M. (2006). Comparative study of the CCF-like pattern recognition protein in different Lumbricid species. *Developmental and Comparative Immunology*, 30, 765-771.




- Sims, R. W., Gerard, B. M. (1985). *Earthworms: Keys and Notes for the identification and Study of the Species (Synopsis of the British Fauna)*. London (UK) Brill/Backhuys: 31.
- Sukumwang, N., Umezawa, K. (2013). Earthworm-derived pore-forming toxin lysenin and screening of its inhibitors. *Toxins (Basel)*, 5(8), 1392-1401.
- Spencer, B., Gillen, F. (1904). *The Northern Tribes of Central Australia*, MacMillan and Co. Ltd., London, UK.
- Sugiura, T., Yamashita, A., Kudo, N., Fukuda, T., Miyamoto, T., Cheng, N., Kishimoto, S., Waku, K., Tanaka, T., Tsukatani, H., and Tokumura, A. (1995). Platelet-activating factor and its structural analogues in the earthworm. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1258, 19-26.
- Sukumwang, N., Umezawa, K. (2013). Earthworm-derived pore-forming toxin lysenin and screening of its inhibitors. *Toxins*, 5, 1392-1401.
- Suzuki, T., Kawasaki, Y., Furukohri, T., and Ellington, W. R. (1997). Evolution of phosphagen kinase. VI. Isolation, characterization and cDNA-derived amino acid sequence of lombricine kinase from the earthworm *Eisenia foetida*, and identification of a possible candidate for the guanidine substrate recognition site. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1348, 152-159.
- Tang, Y., Liang, D., Jiang, T., Zhang, J., Gui, L., and Chang, W. (2002). Crystal structure of earthworm fibrinolytic enzyme component a: revealing the structural determinants of its dual fibrinolytic activity. *Journal of Molecular Biology*, 321, 57-68.
- Tocci, A., Forte, L. (2003). Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematology Journal*, 4, 92-96.
- Tomlin, A. D., and Miller, J. J. (1988). Impact of ring-billed gull (*Larus delawarensis* ord.) foraging on earthworm populations of southwestern Ontario agricultural soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 20(3), 165-173.
- Tuckova, L., Rejnek, J., Bilej, M., and Pospisil, R. (1991) Characterisation of anti-gen-binding protein in earthworms *Lumbricus terrestris* and *Eisenia foetida*. *Developmental & Comparative Immunology*, 15, 263-268.
- Ueda, M., Asano, T., Nakazawa, M., Miyatake, K., and Inouye, K. (2008). Purification and characterization of novel raw-starch-digesting and cold-adapted α -amylases from *Eisenia foetida*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 150, 125-130.
- Ueda, M., Goto, T., Nakazawa, M., Miyatake, K., Sakaguchi, M., and Inouye, K. (2011). A novel cold-adapted cellulase complex from *Eisenia foetida*: characterization of a multienzyme complex with carboxymethylcellulase, β -glucosidase, β -1,3 glucanase, and β -xylosidase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 157, 26-32.

- Ueda, M., Noda, K., Nakazawa, M., Miyatake, K., Ohki, S., Sakaguchi, M., and Inouye, K. (2008). A novel anti-plant viral protein from coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*: Purification, characterization and its identification as a serine protease. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 151, 381-385.
- Ueda, M., Yamaki, K., Goto, T., Nakazawa, M., Miyatake, K., Sakaguchi, M., and Inouye, K. (2011). Purification and characterization of 1,3- β -D-glucanase from *Eisenia foetida*. *Carbohydrate Polymers*, 86, 271-276.
- Ueda, M., Yamashita, T., Nakazawa, M., Miyatake, K., Ohki, S., Sakaguchi, M., and Inouye, K. (2011). Purification and characterization of a new serine protease (EF-SP2) with anti-plant viral activity from *Eisenia foetida*: analysis of anti-plant viral activity of EF-SP2. *Process Biochemistry*, 46, 1711-1716.
- Ukena, K., Oumi, T., Matsushima, O., Ikeda, T., Fujita, T., Minakata, H., and Nomoto, K. (1995). A novel gut tetradecapeptide isolated from the earthworm, *Eisenia foetida*. *Peptides*, 16(6), 995-999.
- Ukena, K., Oumi, T., Morishita, F., Furukawa, Y., Matsushima, O., Takahama, H., Miyata, S., Ikeda, T., Minakata, H., and Nomoto, K. (1997). Immunochemical demonstration of *Eisenia* tetradecapeptide, a bioactive peptide isolated from the gut of the earthworm *Eisenia foetida*, in tissues of the earthworm. *Cell and Tissue Research*, 288, 567-573.
- Valiakos, E., Marselos, M., Grafakou, M.E., Skaltsa, H., and Sakellaridis, N. (2021). Remedies of animal origin and their indications in Nikolaos Myrepsos' Dynameron. *Journal of Ethnopharmacology*, 276, article no: 114191.
- Van Wart, H. E., Steinbrink, D. R. (1981). A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. *Analytical Biochemistry*, 113(2), 356-365.
- Verma, M. K., Pulicherla, K. K. (2016). Enzyme promiscuity in earthworm serine protease: substrate versatility and therapeutic potential. *Amino Acids*, 48(4), 941-948.
- Whitfield Åslund, M., Celejewski, M., Lankadurai, B., P., Simpson, A. J., and Simpson, M. J. (2004). Natural variability and correlations in the metabolic profile of healthy *Eisenia foetida* earthworms observed using ^1H NMR metabolomics. *Chemosphere*, 83, 1096-1101.
- WRI (2000). A Guide to World Resources 2000–2001: People and Ecosystems: The Fraying Web of Life, Published by World Resources Institute, Elsevier Science Ltd., Washington, DC 20002 USA.
- Wu, J.X., Zhao, X.Y., Pan, R., and He, R.Q. (2007). Glycosylated trypsin-like proteases from earthworm *Eisenia foetida*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 399-406.
- Xichun, Z., Zhenjun, S., Rupeng, Z., Quanmin, H., and Guiqiu, L. (2002). Purification and characterization of two antibacterial peptides from *Eisenia foetida*. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Jin Zhan*, 29(6), 955-960.

- Yamaji, A., Sekizawa, Y., Emoto, K., Sakuraba, H., Inoue, K., Kobayashi, H., and Umeda, M. (1998). Lysenin, a novel sphingo-myelin-specific binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 5300-5306.
- Yoshii, K., Ogasawara, M., Wada, J., Yamamoto, Y., and Inouye, K. (2020). Exploration of dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV) inhibitors in a low-molecular mass extract of the earthworm *Eisenia fetida* and identification of the inhibitors as amino acids like methionine, leucine, histidine, and isoleucine. *Enzyme Microbiology and Technology*, 137, article no: 109534.
- Yuan, X., Cao, C., Shan, Y., Zhao, Z., Chen, J., and Cong, Y. (2006). Expression and characterization of earthworm *Eisenia foetida*-1 umbrokinase-3 in *Pichia pastoris*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 36, 273-279.
- Yüksek, T. (2019). Farklı tip yemle beslemenin kırmızı Kaliforniya solucanında solucan sayısı ve ağırlığına etkisi. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 1, 1-6.
- Zhang, F. X., Guo, B., and Wang, H. Y. (1992). The spermatocidal effects of earthworm extract and its effective constituents. *Soil Biology and Biochemistry*, 24, 1247-1251.
- Zeng, Z., Zhang, G., and Xu, Q. (1982). *Earthworm Cultures*, Hubei People's Publ. House, Wuhan, China.
- Zhang, B., Li, Q., and Dang, A. (2016). Simultaneous determination of uracil, hypoxanthine, xanthine, uridine and adenosine in *Eisenia foetida* by HPLC. *China Pharmacy*, 12, 1692-1694.
- Zhao, J., Xiao, R., He, J., Pan, R., Fan, R., Wu, C., Liu, X., Liu, Y., and He, R. Q. (2007). *In situ* localization and substrate specificity of earthworm protease-II and protease-III-1 from *Eisenia fetida*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 67-75.
- Zhenjun, S., Xianchun, L., Lihui, S., and Chunyang, S. (1997). Earthworm as a potential protein resource. *Ecology of Food and Nutrition*, 36(2-4), 221-236.
- Zhu, H., Ownby, D. W., Riggs, C. K., Nolasco, N. J., and Stoops, J. K., (1996). Assembly of the gigantic hemoglobin of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(47), 30007-30021.
- Zimian, D., Yonghua, Z., and Xivu, G. (2005). Medicinal Terrestrial Arthropods in China, in *Ecological Implications of Minilive-stock*, Science Publishers: 482-484.
- Ziyavitdinov, Zh. F., Takanaev, A. A., Veshkurova, O. N., Sagdiev, N. Zh., Mirzaakhmedov, Sh. Ya., Evgrafova, N. A., and Salikhov, Sh. I. (1994). Biologically active proteins of the worm *Eisenia foetida*. *Chemistry of Natural Compounds*, 30(1), 109-111.

EKLER

EK-1. “Kırmızı Kaliforniya Solucan Ekstresi ve Kullanımı” adlı patent başvurusu
(26.12.2019)

 2019/21760		 2019-GE-584042	
26.12.2019			
		PATENT BAŞVURU FORMU	
		P201	
1. BAŞVURU BİLGİSİ			
Başvuru Şekli/Ana Başvuru Numarası	Yeni Başvuru		
Erken Yayın Talebi	Yok		
Buluş Başlığı	KIRMIZI KALIFORNİYA SOLUCAN EKSTRESİ VE KULLANIMI		
Türkçe Çeviri Süre Talebi	Yok		
Referans No			
Patent Sınıfı	A61K,		
Tarifname Dili	TUR		
Tarifname	6 Sayfa		
İstem	11 Adet		
Özet	1 Sayfa		
Resim	4 Sayfa		
Genetik Kaynak	HAYIR		
Kamu Desteği	HAYIR		
2. BAŞVURU SAHİBİ			
Adı-Soyadı/Unvanı	GAZİ ÜNİVERSİTESİ		
Adres	Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Teknikokullar Ankara TÜRKİYE		
Uyruğu	TÜRKİYE	Sahip Türü	Tüzel
		Sahip Profili	Üniversite
3. BULUŞ SAHİBİ			
Adı-Soyadı	ILKAY ERDOĞAN ORHAN		
		Sahip Profili	Akademisyen
		Beyan	Hizmet İlişkisi
4. RÜÇHAN BİLGİLERİ			
Rüçhan Çeşidi	Ülke	Sergi Adı / Başvuru Numarası	Tarih
5. PATENT VEKİLİ			
Vekil Bilgisi			
6.ÖDEME BİLGİSİ			
Ödeme Şekli	Havale		
Dekont/Ödeme Tarihi	25.12.2019		
Dekont/Provizyon Numarası	F01595		
Tutar	40.0		
7.FATURA BİLGİSİ			
Fatura Kesilecek TC - Vergi Numarası			
8.DİĞER BAŞVURU SAHİPLERİ			
(Başvuru Sahibinin Birden Fazla Olması Durumunda Bilgiler Bu Alanda Yer Alacaktır)			
9. DİĞER BULUŞ SAHİPLERİ			
(Birden Fazla Buluş Sahibi Olması Durumunda Bilgiler Bu Alanda Yer Alacaktır)			

EK-2. Ankara Kalkınma Ajansı tarafından yurt çapında düzenlenen proje yarışmasında ilk 100 proje arasına giren, “Kırmızı Kaliforniya Solucanı – Kozmetik Ürün ve Diş Sağlığında Yeni Bir Doğal Hammadde” başlıklı projemizin afişi

<p>Company Name Kırmızı Kaliforniya Solucanı - Kozmetik Ürün ve Diş Sağlığında Yeni Bir Doğal Hammadde</p> <p>Elevator Pitch Dişimizde cildimizde solucan!</p> <p>Categories Biopharma, Biotechnology, Medical</p> <p>Country Turkey</p> <p>City Ankara</p> <p>Team Members</p>	<p>Product/Service Summary Kırmızı Kaliforniya solucanı (KKS) ıslah edilmiş bir kültür solucanı türüdür. KKS'nin homojenize edilmesiyle hazırlanan ekstrelerin yara iyi edici etkisi, antifungal, antikoagülan ve antioksidan etkileri bilinmektedir. Bu özellikleri ile Diş Hekimliği klinik uygulamaları için aday bir hammadde. Bu amaç ile diş pulpası kök hücre gelişimi, kemikleşmesi ve ekstraselüler matriks (ESM) üretimi üzerine etkisi araştırılmış ve olumlu etkileri belirlenmiştir. ESM miktarını artması kozmetik alanında da faydalı ola Kök hücrelerin salgıladıkları faydalı maddeler olan sekretomların KKS ile kozmetik alanında da kullanılabilceği önerilmektedir. KKS içeren ağız ve yüz temizleme sularının doğal ve iyileşmeye yardımcı ürün olacağına inanılmaktadır.</p> <p>Problem Kimyasal ajanlarla ağız sağlığının korunması ve yüz temizliğinin gerçekleştirilmesi pahalı bir mittir. Bilinen markalar içinde yer alan klorheksidin, yalnızca bakterileri ortamdaki uzaklaştırmaktadır. Oysa, oral floradan patojenler ile birlikte faydalı bakterilerin giderilmesi arzu edilen bir durum değildir. Düzenli klorheksidin kullanan kişilerde diabetin %55 arttığı tespit edilmiştir. Makyaj temizleme suları, içerdiği SLS, paraben ve diğer kimyasallar ile olumsuz etkilere sahiptir.</p> <p>Solution</p>	<p>Competitive Landscape Elde edilecek ürünler Ar-Ge ürünüdür. Veriler bilimsel çalışmalarla desteklenmiştir.</p> <p>Business Model 1. KKS üretim çitliği ile anlaşarak yılda 1000 kg KKS ekstresi elde etmek 2. KKS ekstresini kozmetik firması ile anlaşarak ağız gargarası ve temizleme suyu şeklinde üretmek 3. KKS ile kültür edilmiş diş pulpası kök hücrelerinden sekretom elde etmek 4. TEYDEB Projesi ile diş pulpası kök hücresi sekretomlarını elde etmek 5. Patent başvurusunda bulunmak 6. Teknokent bünyesinde firma oluşturmak</p> <p>Customer Segments Kozmetik ürünler kişisel bakım pazarında ağız bakım suları ve yüz temizleme suyu segmenti hedef alınacaktır.</p> <p>Market Size 2017 yılı itibarı ile dünya kozmetik pazar büyüklüğü 500 milyar dolar, Türkiye kozmetik pazarı 11 milyar dolara yakındır.</p> <p>Competitive Advantage Mucize olarak adlandırılan Kırmızı Kaliforniya Solucanı (KKS) içerecek doğal ağız gargarası diş sağlığının korunmasında diş pulpası kök hücre ESM miktarını koruyarak, yara iyileşmesini hızlandırarak ve antibakteriyel</p>
---	--	---

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : ASLAN, Şirin Melis
Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	2013
Lise	Kırşehir Anadolu Öğretmen Lisesi	2007

İş Deneyimi, Yıl

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2018- devam ediyor 2014-2018	Kayseri Devlet Hastanesi Zonguldak İl Sağlık Müdürlüğü	Eczacı Eczacı

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Ş.M. Aslan, F.S. Şenol, A. Mendi, İ. Erdoğan Orhan, H. Ulutürk, T. Yüksek, D. Yılmaz:
“Kırmızı Kaliforniya Solucanı Ekstrelerinin Enzim İnhibitör ve Mezenkimal Kök
Hücre Kültürü Üzerindeki Etkileri – Kozmetik Ürün ve Diş Sağlığında Yeni Bir
Doğal Hammadde”, 14. Türkiye Eczacılık Kongresi, 1-3 Kasım, 2018, Ankara.

Ş.M. Aslan, F.S. Şenol, A. Mendi, İ. Erdoğan Orhan, H. Ulutürk, T. Yüksek, D. Yılmaz:
“Kırmızı Kaliforniya Solucanı Ekstrelerinin Enzim İnhibisyon ve Hücre Kültürü
Üzerindeki Etkilerine Dair Ön Sonuçlar”, Avrasya Doğal Beslenme ve Sağlıklı
Yaşam Zirvesi (Doğal 2018), 12-15 Temmuz, 2018, Ankara.

Hobiler

Farklı kùltùrlere ait yemekler denemek, seyahat etmek, doęa yürüyüşü yapmak, yüzmek, kayak yapmak, pilates ve yoga yapmak, puzzle yapmak, kaktüs yetiştirmek, kitap okumak



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

