

**5S PHARMA İLAÇ, KOZMETİK, TIBBİ CİHAZ, FORMÜLASYON & ARGE & EĞİTİM-DANIŞMANLIK LTD.ŞTİ.**

30.12.2019

**TEST SONUÇ RAPORU**

**Rapor No: 5S-Eİ-002**

**Talep Eden Kurum:** Erciyes İlaç Bitkisel Destek Ürünleri Ar-Ge San. Tic. Ltd. Şti

**Talep Edilen Test:** İn Vivo Antiepileptik Etkinlik Tarama Testleri (Toksosite ve Elektrokortikografi çalışmaları)

**Numune Bilgileri:** Erciyes İlaç Bitkisel Destek Ürünleri Ar-Ge San. Tic. Ltd. Şti tarafından tarafımıza 200 g Eİ-002 kaba toz numune teslim edilmiştir. İlgili firma teslim edilen numunenin 1:1:1 oranlarında bitki türlerinin karıştırılması ile elde edildiğini beyan etmiştir. Numunelerin tahlil ve tanımlamalarında firmamız herhangi bir çalışma yürütmemiş olup bu konudaki sorumluluk tamamı ile Erciyes İlaç Bitkisel Destek Ürünleri Ar-Ge San. Tic. Ltd. Şti'ye aittir.

**Not:** Bu rapor 13 sayfadan oluşmaktadır.

**Çalışma Koordinatörü:**

Dr. Gökhan Ünal

Kurucu ortak, Beşeri Ürünler Direktörü (COO)

**5S PHARMA**  
5S PHARMA İLAÇ, KOZMETİK, TIBBİ CİHAZ  
EĞİTİM VE DANIŞMANLIK LTD. ŞTİ.  
Yıldırım Beyazıt Mh. Aşık Veysel Blv. E.Ü.TGB İdare  
ve Kuluçka 4 Apt. No: 67/3/81 Melikgazi / KAYSERİ  
ERCİYES Y.Ü. D. 001 164 9224  
Mersis No: 080180422400001 - Tic.Sic.No: 50879

Yıldırım Beyazıt Mh. Aşık Veysel Blv. E.Ü. TGB İdare ve Kuluçka  
4 Apt. No: 67/3/81  
Melikgazi / KAYSERİ

www.5spharma.com  
info@5spharma.com;  
5spharma.ltd@gmail.com

**5S PHARMA**  
İlaç, Kozmetik, Tıbbi Cihaz  
Formülasyon & Ar-Ge & Eğitim-Danışmanlık  
Ltd. Şti.

**Giriş, Amaç ve Çalışma Hipotezi:** Epilepsi toplumda yaklaşık %1 prevalansı ile nörolojik hastalıklar arasında önemli yer tutan kompleks bir hastalıktır. Hastalık başlıca beklenmeyen ve tekrarlayıcı nitelikte meydana gelen ve normal beyin fonksiyonlarını engelleyen nöbetler ile karakterizedir. Hastalık patogenezi için yapılan çalışmalar genellikle hastanın herhangi bir beyin bölgesinde bilinmeyen sebepler ile başlayan elektriksel uyarının beyin bir bölümünü veya tamamını kontrol altına alması sonucu çeşitli nitelikte nöbetlerin ortaya çıktığını göstermektedir. Epilepsinin mevcut koşullar altında kökten (radikal) bir tedavisi bulunmamasıyla birlikte kullanılan antiepileptik ilaçlar nöbet sıklık ve şiddetini azaltmaya yöneliktir. Buna rağmen hastaların yaklaşık 1/3'ü mevcut antiepileptik ilaçlara veya alternatif tedavilere (cerrahi gibi) cevap vermemektedir ve tedaviye dirençli hastaları oluşturmaktadır. Bunun yanında tedavide kullanılan antiepileptik ilaçların önemli yan etkileri hastaların tedaviye uyma isteklerini (tedavi uyumlarını) azaltmaktadır. Bu sebepten dolayı dirençli hastalarda da antiepileptik etki gösterecek ve yan etki profili olarak avantaj sağlayacak yeni ilaçların keşfi son derece önemlidir. İlaç keşfinde en önemli basamaklardan birisi şüphesiz deney hayvanlarında geliştirilen hastalık modellerinin kullanılmasıdır. Deneysel epilepsi çalışmaları, hastalığın temel mekanizmalarının aydınlatılması ve yeni antiepileptik ilaç keşfi gibi önemli avantajlar sunmaktadır. Kemirgenlerde epilepsi modeli oluşturulması genellikle beyin elektriksel veya kimyasal yolla uyarılarak epileptik nöbetlerin ortaya çıkarılması esasına dayanmaktadır. Bu amaç ile pentilentetrazol (PTZ) yaygın olarak kullanılan kimyasal maddelerden birisidir. Akut PTZ uygulaması genellikle akut jeneralize nöbetleri ortaya çıkarmada tercih edilirken kronik PTZ modelleri ise hem davranışsal hem de beyinde yapısal olarak epilepsi tablosu oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır. Santalaceae ve Fabaceae familyalarına ait bazı bitki türleri Avrupa ve Asya'da geleneksel tıp yaklaşımı ile elde edilen ekstraktlar halk arasında antiepileptik amaçlar ile de kullanılmaktadır. Yapılması planlanan bu çalışmada tarafımıza teslim edilen EI-002 numunesinin epilepsi üzerine nörofizyolojik/elektrofizyolojik açıdan faydalı etkilerinin bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. Bu amaç ile çalışmamızda kronik PTZ uygulaması ile epileptik tutuşma (kindling) modeli oluşturulmuş sıçanlarda tarafımıza teslim edilen numunenin antikonvülzan aktivitesinin bulunup bulunmadığı elektrokortikografi (EKoG) yöntemi ile araştırılmıştır. Bunun yanında prelinik çalışmaların bir gereği olarak çalışmada kullanılan dozların güvenliğinin değerlendirilmesi amacıyla deney hayvanlarında akut ve subakut toksisite testleri de gerçekleştirilmiştir.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmamızda kullanılmak üzere tarafımıza bir adet kaba toz numunesi teslim edilmiştir. Ön çalışmalarda bu numunenin aktif dozunun 1g/kg ve 2g/kg olduğu tespit edilmiştir. Bu numuneler belirlenen dozları sağlamak için uygun miktarlarda tartılarak %10 Tween 80 yüzey aktif maddesi içeren distile su içerisinde disperse edilmiştir. Hazırlanan çözelti deney hayvanlarına 5 ml/kg olacak şekilde gastrik gavaj ile uygulanmıştır.

### Toksisite Çalışmaları

Bir kimyasal maddenin toksisite potansiyelini öğrenmek için akut toksisite testlerini yapmak zorunluluğu vardır. En yaygın kullanılan akut toksisite testi letalite testidir. Bu testin amacı, bir kimyasal maddeye maruziyetin sonucu ortaya çıkabilecek toksik semptomları, beyin, böbrek, karaciğer gibi belli başlı organların etkileniş derecesi veya öldürücü doz (letalite) değerini saptamaktır. Letal doz değeri, o maddenin ne kadar güvenli kullanılabileceğinin de bir göstergesi olarak kabul edilir. Bir defada verildiğinde test grubundaki hayvanların % 50'sini öldüren doza, o maddenin letal dozu (LD50) denir. Kimyasal maddelerin kısa süreli maruziyetine bağlı akut toksik etkilerini değerlendirmek açısından LD50 değeri önemlidir. Çalışmamızda akut ve subakut toksisite testlerinin gerçekleştirilmesi için 6 adet dişi Wistar Albino sıçan kullanılmıştır. Bu deney hayvanlarına akut toksisite testi için 5 g/kg/gün ve subakut toksisite testi için 2 g/kg/gün numune gastrik gavaj uygulaması ile verilmiştir. Akut toksisite testinde LD50 değerlerinin belirlenmesi için uygulamayı takiben 24 saat deney hayvanları gözlem altında tutulmuştur. Subakut toksisite testinde ise 7 gün boyunca 2 g/kg/gün tedavi alan deney hayvanları toksisite açısından değerlendirilmiştir. Toksikite derecelendirmesi için Hodge ve Sterner Skalası kullanılmıştır.

**Hodge ve Sterner Skalasına Göre Toksisitenin Derecelendirilmesi**

Toksisite derecesi	Oral LD50 mg/kg (sıçan, tek doz)	Inhalasyon LC50 ppm (sıçan, 4 saat maruziyet)	Dermal LD50 mg/kg (tavşan, derlye tek uygulama)	İnsanlar için muhtemel öldürücü doz
1 Son derece toksik	<1	<10	<5	Bir damla veya 4 ml
2 Şiddetli toksik	1-50	10-100	5-43	30 ml
3 Orta derecede toksik	50-500	100-1000	44-340	600 ml
4 Az toksik	500-5000	1000-10.000	350-2810	1 litre
5 Pratik olarak toksik değil	5000- 15.000	10.000- 100.000	2820-22.590	1 litre
6 Rölatif olarak zararsız	>15.000	>100.000	>22.600	1 litre

### Elektrokortikografi Çalışmaları

Çalışmamızda 6 aylık, dişi, Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Bu sıçanlar her grupta 6 sıçan olmak üzere PTZ (40 mg/kg), Numune (1g/kg) ve Numune (2g/kg) olarak üç deney grubuna ayrılmıştır. PTZ (2 ml/kg) deney hayvanlarına intraperitoneal yolla, numuneler (5 ml/kg) ise oral yoldan gastrik gavaj ile uygulanmıştır. Numune içeriğinin PTZ uygulanmadan önce sistemik dolaşıma yeterli miktarda geçmesini sağlamak amacı ile bu uygulamalar PTZ'den 2 saat önce gerçekleştirilmiştir. Epileptik kindling modeli oluşturulmaya başlanılmadan önce 7 gün süre ile ilgili deney gruplarına günde 1 kez 1 g/kg ve 2 g/kg olmak üzere numune uygulanmıştır. Bu sürecin ardından Fisher ve Kittner kronik epilepsi tutuşma ölçeğine göre çalışmadaki tüm deney hayvanlarına (numune grupları dahil) haftanın 3 günü (Pazartesi, Çarşamba ve Cuma) düzenli olarak 40 mg/kg dozda PTZ enjeksiyonu yapılmıştır. Numune gruplarına PTZ (40 mg/kg) enjeksiyonundan 2 saat önce 1 g/kg ve 2 g/kg numune uygulanmıştır. İlgili gruplara numune PTZ uygulansın veya uygulanmasın aralıksız olarak her gün belirtilen dozlarda uygulanmıştır. Her PTZ enjeksiyonundan sonra deney hayvanlarından 30 dakika boyunca video kaydı alınmıştır. Bu sürede Fisher ve Kitner ölçeğine göre evre 3 ve üzeri nöbet geçiren deney hayvanları o günkü deneyde tutuşmuş olarak nitelendirilecektir. Kronik tutuşma modeli oluşumu esnasında ardarda 3 enjeksiyon gününde veya aralıklı olarak 5 enjeksiyon gününde evre 3 ve üzeri nöbet geçiren deney hayvanı tutuşmaya yatkın olarak kabul edilmiş ve EKOg çalışması için elverişli olarak nitelendirilmiştir. Deney hayvanları EKOg için elverişli duruma geldikten sonra bu hayvanların kortekslerine cerrahi işlem ile EKOg kaydı almamıza olanak sağlayacak elektriksel düzenekler implante edilmiştir. Bu cerrahi operasyon kısaca özetlenecek olursa anestezi altındaki sıçanların kafa derilerine 3 cm uzunluğunda bir insizyon açıldıktan sonra beynin sol frontal korteks, sol oksipital korteks ve sağ oksipital kortekse beyin zarı ile temas eden elektrotlar yerleştirilmiş ve akrilik ile kafatasına sabitlenmiştir. Bu işlemden sonra postoperatif bakım amacı ile deney hayvanlarına enfeksiyonu önlemek için 3 gün boyunca antibiyotik ve ağrı kesici ilaç uygulanmıştır. Cerrahi işlemden sonra hayvan 1 hafta dinlenmeye protokolüne bırakılmıştır. Bir haftanın ardından deney hayvanlarında numunelerin antikonvülzan etkilerinin EKOg düzeyinde değerlendirilmesi için daha önce uygulanan PTZ ve numune tedavileri tekrarlanmıştır. PTZ uygulanmasını takiben deney hayvanlarında 30 dk boyunca PowerLab veri kazanım sistemi ile EKOg kaydı alınmıştır. Bu şekilde beyinden Elektrokortikografi kaydı elde edilmiş ve elde edilen bu kayıtlar offline olarak analiz edilmiştir. Kaydedilen elektrofizyolojik kayıtlar Chart v5.1 (ADInstruments, Avustralya) birer dakikalık bölümlere ayrılarak, her bir dakika başına düşen spike sayısı ve toplam spike

sayıları, yazılım içinde yer alan makro komutlarıyla otomatik olarak hesaplanmıştır. Deneyde kullanılan tüm hayvanlardan elde edilen kayıtlar için bu hesaplama teker teker yapılmış ve elektrofizyolojik kayıtların tamamı Microsoft Excel aracılığı ile rakamsal verilere dönüştürülmüştür. Deney hayvanlarına EKOg kayıt düzeneği implante edildikten sonra farklı günlerde numunelerin etkinliği farklı farklı PTZ dozlarına (40 mg/kg, 45 mg/kg, 60 mg/kg) karşı test edilmiştir.

**Bulgular:** Toksikite testlerinde ilgili numune deney hayvanlarında mortaliteye sebep olmamıştır. Bu bulgular yapmış olduğumuz testlerde LD50 değerlerimizin akut uygulama için 5 g/kg/gün ve subakut (7 gün) uygulama için 2 g/kg/gün'den daha yüksek olduğunu göstermektedir (Tablo 1).

**Tablo 1.** Akut ve subakut toksisite testlerinde LD50 değerleri

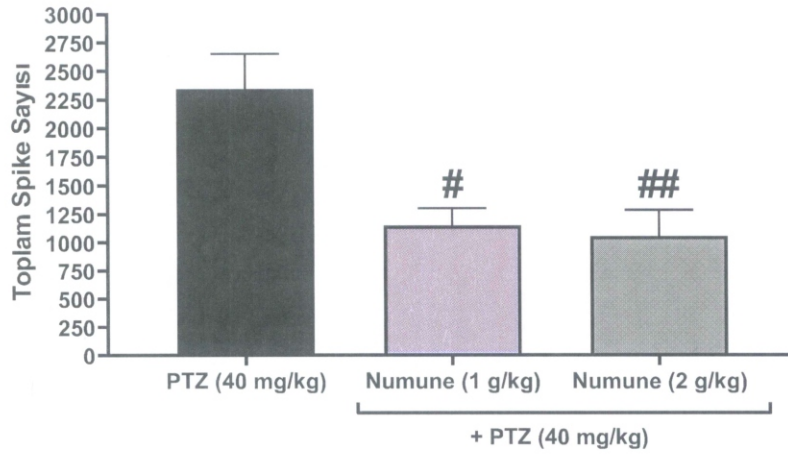
Test	LD50 değeri	Mortalite (x/6)
Akut Toksikite	>5000 mg/kg/gün	0
Subakut Toksikite (7 gün)	>2000 mg/kg/gün	0

Çalışmamızda kronik PTZ (40 mg/kg) uygulaması ile 21 gün boyunca gerçekleştirilen deneylerde PTZ grubunda yer alan deney hayvanlarının %30'u, PTZ (40 mg/kg) öncesinde 1 g/kg numune tedavisi alan deney hayvanlarının %15'i ve 2 g/kg tedavi alan deney hayvanlarının %6'sının jeneralize nöbet (Fisher ve Kitner ölçeğine göre evre 3'den büyük nöbet) geçirdikleri tespit edilmiştir. Bu bulgu özellikle 2 g/kg dozundaki numunenin nöbete karşı koruyucu etkinliğinin bulunduğunu göstermektedir (Tablo 2).

**Tablo 2.** Jeneralize nöbet oluşma oranları

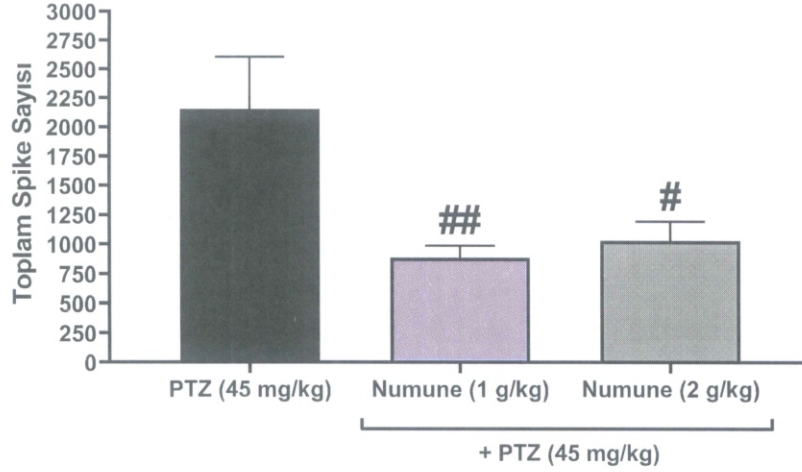
Tedavi	Jeneralize Nöbet (>Evre 3) Oluşma Oranı (%)
PTZ (40 mg/kg)	30
PTZ (40 mg/kg) + Numune (1 g/kg)	15
PTZ (40 mg/kg) + Numune (2 g/kg)	6,66

Çalışmamızda 40 mg/kg PTZ uygulaması ile deney hayvanlarında tutuşma modeli oluşturulması için toplamda 3 hafta boyunca belirtilen takvime göre pazartesi, çarşamba ve cuma günleri PTZ enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanları EKog kaydı alınacağı güne kadar toplamda 28 gün aralıksız olarak 1 g/kg veya 2 g/kg numune tedavisi almışlardır. Çalışmamızda 1 g/kg ve 2 g/kg deney hayvanlarının 40 mg/kg PTZ ile oluşan EKoG dalgaları üzerine önemli modülatör etkilerinin bulunduğu, PTZ grubundaki deney hayvanlarının toplam spike sayılarını istatistiksel açıdan anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir (sırası ile  $p<0.05$  ve  $p<0.01$ ; Şekil 1; Ek 1; Ek 2; Ek 3).



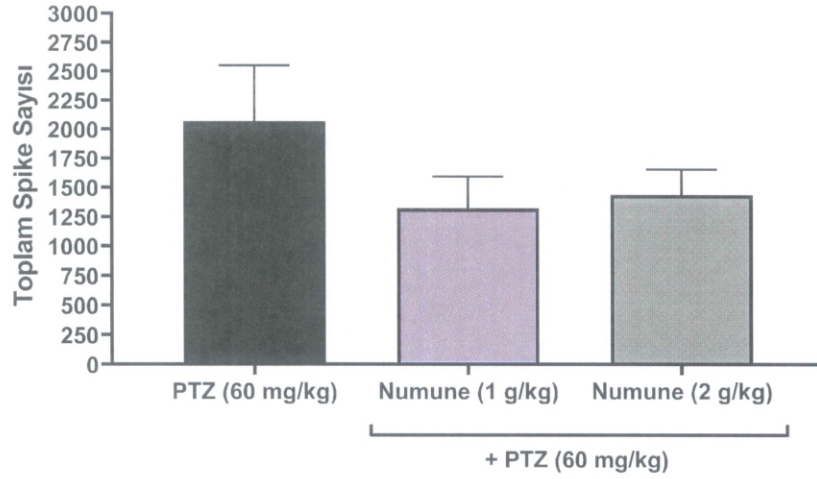
**Şekil 1.** PTZ (40 mg/kg) ve numune tedavileri alan deney hayvanlarının EKoG kayıtlarında toplam spike (dikensi dalga) sayıları. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü varyans analizi (ANOVA)'yı takiben Dunnett'in post hoc testi ile gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak sunulmuştur. PTZ grubu ile kıyaslandığında #:  $p<0.05$ 'i ve ##:  $p<0.01$ 'i ifade etmektedir.

Çalışmamızda 1 g/kg ve 2 g/kg numune tedavilerinin 45 mg/kg PTZ ile oluşan EKOg dalgalarındaki toplam spike sayılarını önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir (sırası ile  $p<0.01$  ve  $p<0.05$ ; şekil 2).



**Şekil 2.** PTZ (45 mg/kg) ve numune tedavileri alan deney hayvanlarının EKOg kayıtlarında toplam spike (dikensi dalga) sayıları. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü varyans analizi (ANOVA)'yı takiben Dunnett'in post hoc testi ile gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak sunulmuştur. PTZ grubu ile kıyaslandığında #:  $p<0.05$ 'i ve ##:  $p<0.01$ 'i ifade etmektedir.

Çalışmamızda 60 mg/kg dozunda PTZ uygulamasından 2 saat önce uygulanan 1 g/kg ve 2 g/kg dozlarındaki numunelerin toplam spike sayısını azaltma eğiliminde oldukları fakat bu eğilimin istatistiksel açıdan anlamlılık düzeyini yakalayamadığı görülmüştür (Şekil 3).



**Şekil 3.** PTZ (60 mg/kg) ve numune tedavisi alan deney hayvanlarının EKOg kayıtlarında toplam spike (dikensi dalga) sayıları. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü varyans analizi (ANOVA)'yı takiben Dunnett'in post hoc testi ile gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak sunulmuştur.



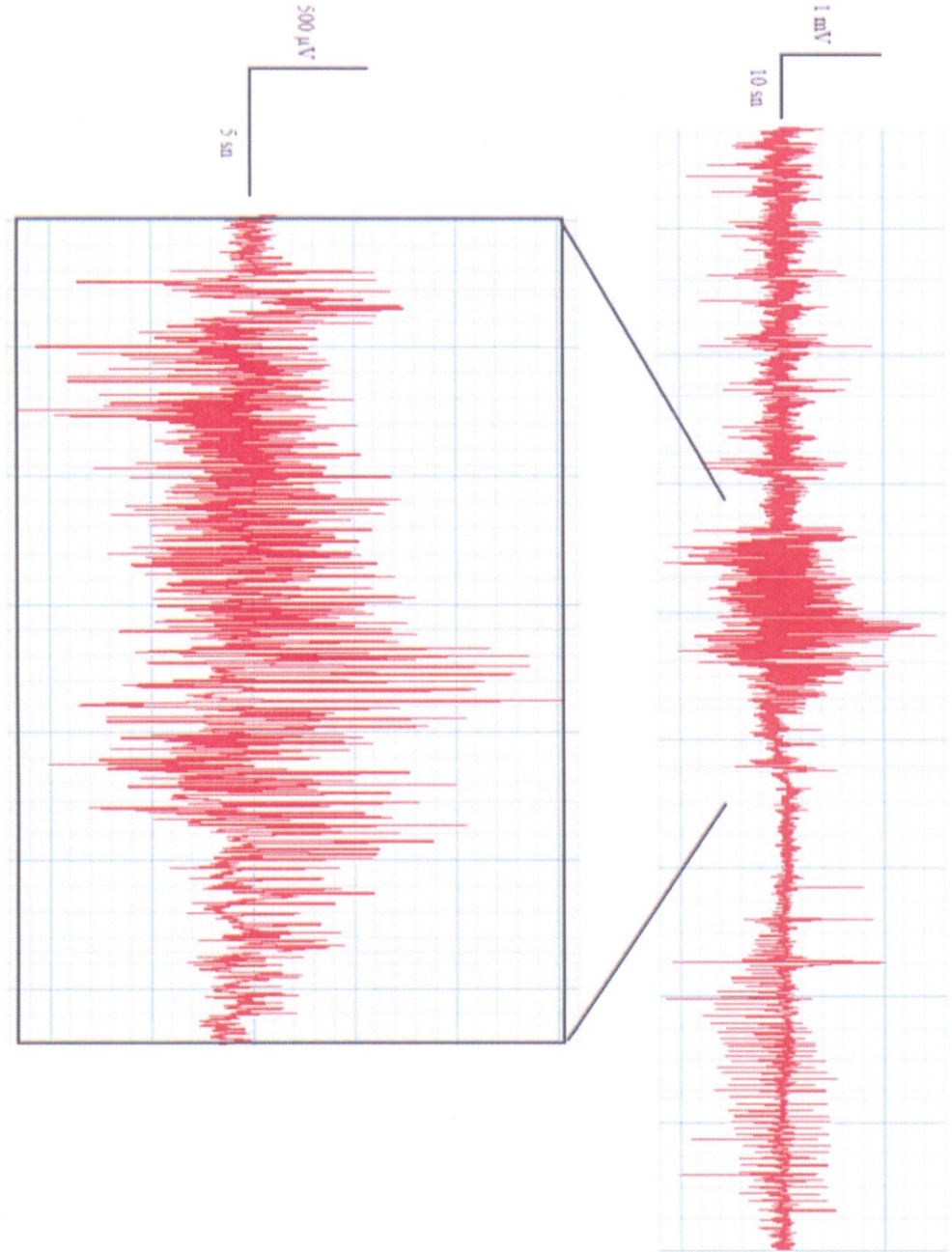
**Sonuç ve Yorum:** Kronik PTZ uygulaması ile deney hayvanlarında epileptik tutuşma (kindling) modelinin oluşturulması ve bu modelde özellikle doğal veya sentetik yapıli saf maddelerin, bitkisel ektrelerin veya çeşitli formülasyonların antikonvülzan etki potansiyelinin değerlendirilmesi çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışma genel itibari ile PTZ öncesinde koruyucu etkinliği değerlendirilecek olan maddenin PTZ enjeksiyonunu takiben bir süre deney hayvanlarının elektrofizyolojik açıdan gözlemlenmesi ve bu gözlemin EKOg yöntemi ile kayıt altına alınması esasına dayanmaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmada Erciyes İlaç Bitkisel Destek Ürünleri Ar-Ge San. Tic. Ltd. Şti tarafından firmamıza teslim edilen numunenin akut ve subakut toksisite testleri ile güvenliği ve kronik PTZ uygulaması ile tutuşma modeli gerçekleşen deney hayvanlarında PTZ'nin oluşturduğu EKOg paterni üzerine etkileri incelenmiştir.

Çalışma bulgularımız tarafımıza teslim edilen numunenin akut uygulamada 5 g/kg/gün, subakut uygulamada ise 2 g/kg/gün dozlarında güvenle kullanılabileceğini göstermektedir. Kullanılan dozlarda hiçbir deney hayvanında mortalite gözlenmemesi bu numunenin LD50 değerinin 5 g/kg/gün'den daha yüksek olduğunu göstermektedir. Hodge ve Sterner skalasına LD50 doz değerinin 5 g/kg/gün değerinden yüksek olması kullanılan numunenin pratik olarak toksik olmadığını göstermektedir.

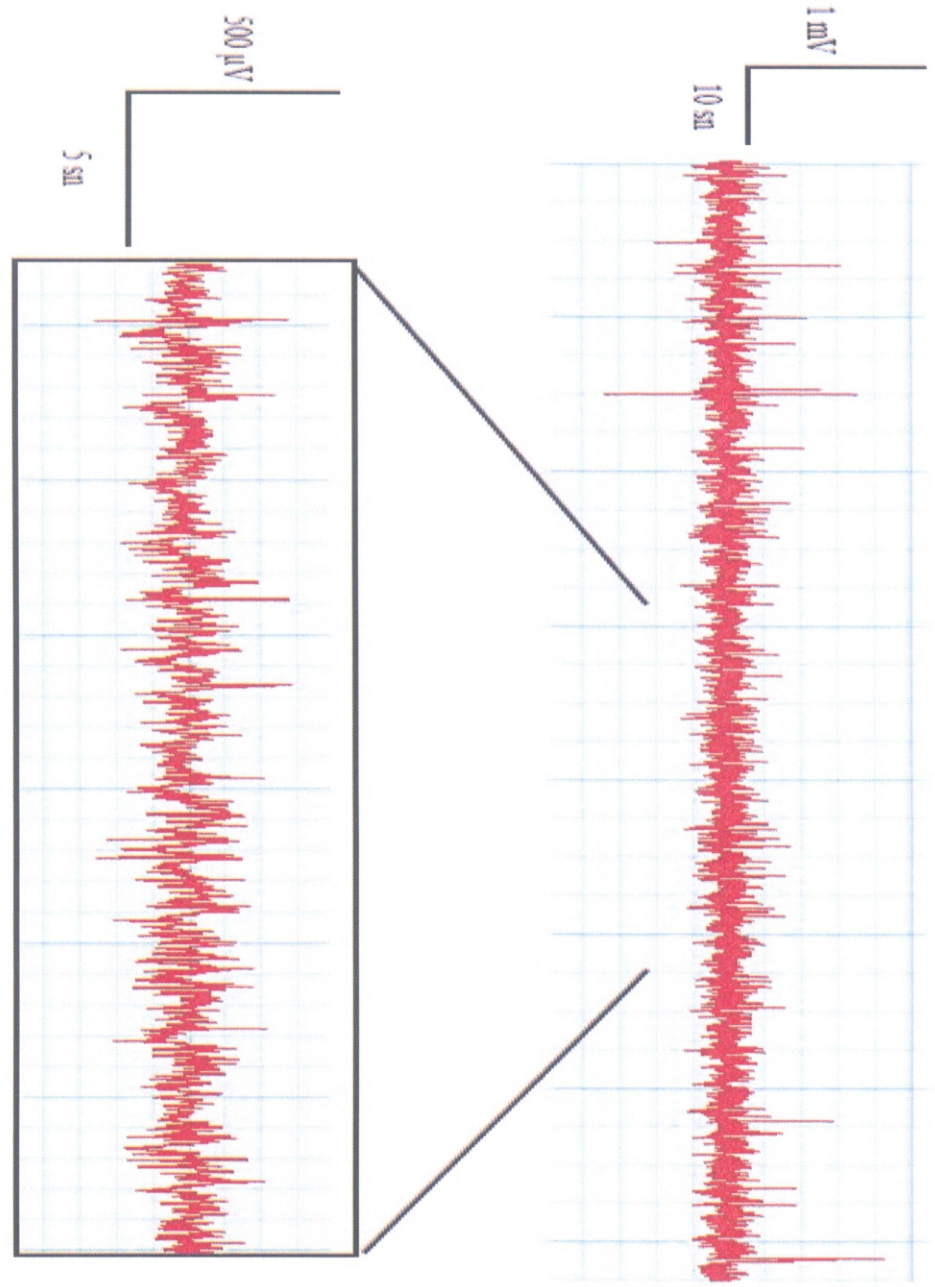
Deneyisel epilepsi modelinin beyinde önemli bir göstergesi olan ve beyindeki aşırı nöronal deşarjın ve kontrolsüz elektriksel uyarımı temsil ettiği düşünölen bozulmuş EKOg dalgaları üzerine faydalı etkilerinin bulunduğunu göstermektedir. Buna ilave olarak davranışsal açıdan da incelendiğinde tarafımıza teslim edilen numunenin deney hayvanlarının jeneralize nöbet (Fisher ve Kitner ölçeğine göre evre 3'den büyük nöbetler) oluşumunu azalttığı tespit edilmiştir. Bunun yanında çalışmamızda toksikolojik analizler yapılmamış olmakla birlikte gözlemlerimize göre numune uygulanan deney hayvanlarında uygulanmayan deney hayvanlarına göre fazladan bir mortalite/advers reaksiyon tespit edilmemiştir.

Yukarıdaki verilen tüm bulgular birlikte yorumlandığında tarafımıza teslim edilen numunenin deney hayvanlarında kronik PTZ uygulaması ile oluşturulan epileptik tutuşma modelinde hem davranışsal hem de elektrofizyolojik olarak faydalı etkilerinin bulunduğu görölmüştür. Bu bulgular ışığında söz konusu numune epilepsi tedavisindeki kısıtlılıklar göz önünde bulundurulduğunda ümit vaad edici olarak yorumlanmaktadır.

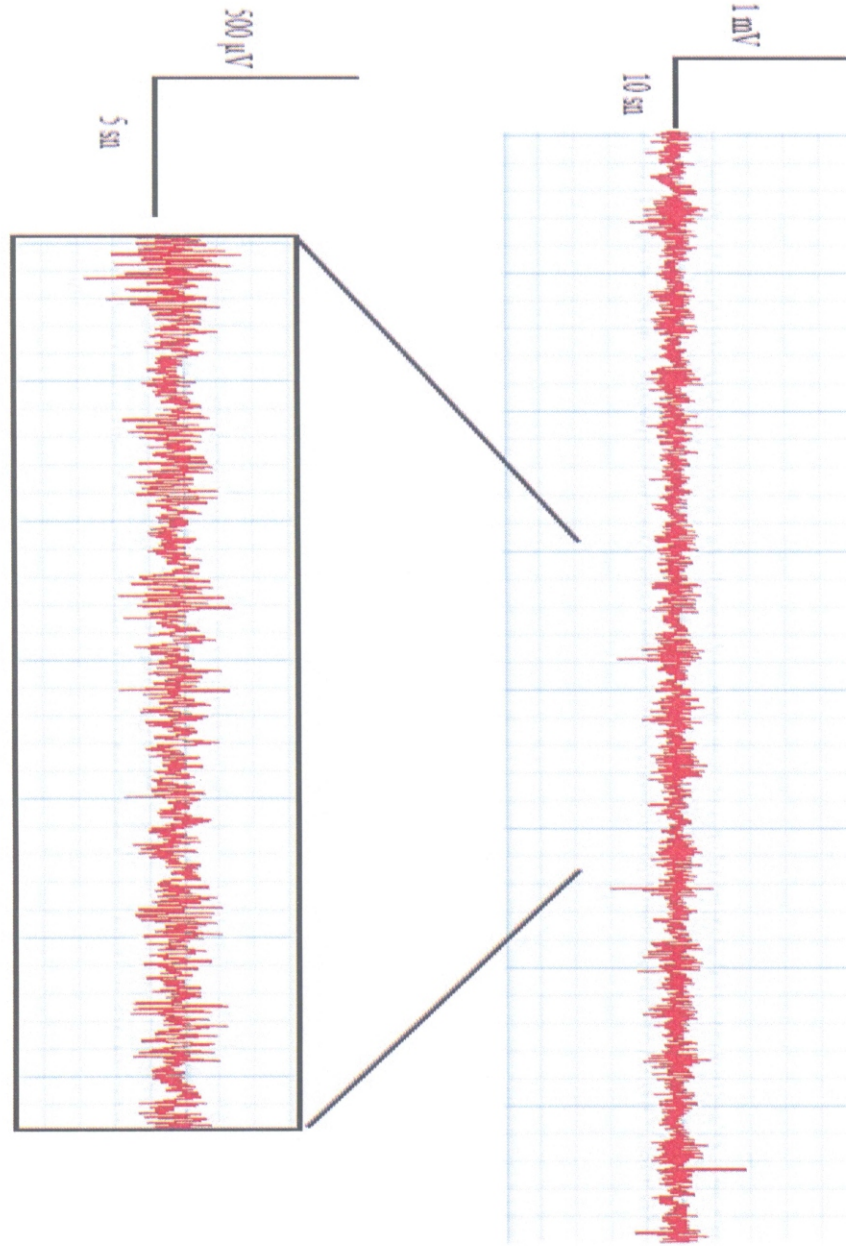
Bunun yanında üretilebilir, nitelikli, ilaç olma potansiyeli yüksek ürünler elde etmek amacı ile numune içerisinde yer alan bitkilerin standart ekstralarının elde edilmesi/üretilmesi ve bu ekstralar üzerinden katma değeri yüksek, nitelikli AR-Ge faaliyetleri ile geliştirilmiş formülasyonların ortaya konulması tavsiye edilmektedir. Ayrıca söz konusu numunenin kronik kullanımı ile özellikle beyin olmak üzere diğer organlarda da gerçekleşen yapısal, moleküler ve biyokimyasal değişikliklerin araştırılmasının numunenin kabul edilebilir, bilimsel temellere dayanan ve ilaç olma potansiyeli taşıyan bir aday haline gelmesi yolunda önemli bir adım olacağı düşünülmektedir.



Ek 1. PTZ (40 mg/kg) grubunda alan yer alan deney hayvanına ait EKG görüntüsü



Ek 2. PTZ (40 mg/kg) + 1 g/kg numune tedavisi grubunda alan yer alan deney hayvanına ait EKoG görüntüsü



Ek 3. PTZ (40 mg/kg) + 2 g/kg numune tedavisi grubunda alan yer alan deney hayvanına ait EKOg görüntüsü