

Türkiye’de Yetişen İki *Vincetoxicum* Taksonunun Tohumlarının Antimikrobiyal, Antibiyofilm Aktiviteleri ve Sinerjik Etkilerinin Araştırılması*

Investigation on Antimicrobial, Antibiofilm Activities; and Synergistic Effects of Seeds of Two *Vincetoxicum* Taxa Growing in Turkey

Zehra Öksüzⁱ, Sevda Güzel Karaⁱⁱ

ⁱ Arş Gör Dr, Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji AD., <https://orcid.org/0000-0002-1542-0556>

ⁱⁱ Doç Dr, Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi AD., <https://orcid.org/0000-0002-6642-5824>

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı bazı türleri geleneksel olarak nevroz, sıtma, skrofula, uyuz, ateş, eksternal kanserler, incinme ve yara tedavisinde kullanılan *Vincetoxicum* cinsine ait iki taksonun (*Vincetoxicum canescens* subsp. *pedunculata* (VC) ve *Vincetoxicum fuscatum* subsp. *fuscatum* (VF)) tohumlarının antimikrobiyal, antibiyofilm aktiviteleri ve sinerjik etkilerini incelemektir.

Yöntem: Öğütülmüş tohumlardan elde edilmiş etanolü ekstrelerin antimikrobiyal etkinlikleri mikrodilüsyon yöntemiyle 5 referans bakteri suşu (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*) ve 2 referans maya suşuna (*Candida albicans* and *Candida parapsilosis*) karşı test edilmiştir. Ayrıca ekstrelerin *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu inhibe etme ve oluşmuş biyofilm üzerine etkisi kristal viyole yöntemi ile değerlendirilmiştir. Biyofilm testleri ile minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyonu (MBIC₅₀) ve minimum biyofilm azaltma konsantrasyonu (MBRC₅₀) belirlenmiştir. *E.coli*'ye karşı iki ekstre arasındaki sinerjik etkiyi değerlendirmek için ise mikrodilüsyon dama tahtası yöntemi kullanılmıştır.

Bulgu: Ekstreler, test edilen bakteri ve mayaları 62,5–250 µg/mL minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) aralığında inhibe etmiştir. VF ve VC ekstrelerinin 0,5X ve 0,25X MİK'de biyofilm oluşumunu sırasıyla %47, %39 ve %50, %34 oranında inhibe ettiği ve iki ekstrelerin MBIC₅₀ değerinin 62,5 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ekstrelerin önceden oluşmuş biyofilm 1X ve 2X MİK'de sırasıyla %54, %62 ve %56, %61 oranında inhibe ettiği ve MBRC₅₀ değerinin 125 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Dahası ekstrelerin *E.coli*'ye karşı aditif etki (FİK=0,62) gösterdikleri de tespit edilmiştir.

Sonuç: Test edilen ekstreler orta ve düşük antimikrobiyal etki göstermekle birlikte hem biyofilm oluşumunu engelleme hem de oluşmuş biyofilm ortadan kaldırmada iyi etkinliğe sahiptir.

Anahtar Kelimeler: *Vincetoxicum canescens* subsp. *pedunculata*, *Vincetoxicum fuscatum* subsp. *fuscatum*, Tohum, Antimikrobiyal, Antibiyofilm, Sinerji testi

ABSTRACT

Aim: The aim of this study is to examine the antimicrobial, antibiofilm activities, and synergistic effects of the seeds of two *Vincetoxicum* taxa [*Vincetoxicum canescens* subsp. *pedunculata* (VC) and *Vincetoxicum fuscatum* subsp. *fuscatum* (VP)] of which some species have been traditionally used to treat neurosis, malaria, scrofula, scabies, internal fever, external cancers, injuries, and wounds.

Methods: Antimicrobial activities of ethanolic extracts obtained from seeds were determined by the microdilution method against 5 reference bacterial strains (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*) and 2 reference fungal strains (*Candida albicans* and *Candida parapsilosis*). Effect of the extracts on inhibiting biofilm formation and on formed biofilm was determined by the crystal violet method. Minimum biofilm inhibition concentration (MBIC₅₀) and minimum biofilm reduction concentration (MBRC₅₀) were determined by biofilm tests. The microdilution checkerboard method was used to evaluate the synergistic effect between the two extracts against *E.coli*.

Results: The extracts inhibited the tested bacteria and yeasts in the minimum inhibition concentrations (MIC) range of 62.5–250 µg/mL. It was determined that tested VF and VC extracts inhibited biofilm formation by 47%, 39%, 50%, and 34% at 0.5X and 0.25X MIC, respectively, and the MBIC₅₀ value of both extracts was 62.5 µg/mL. In addition, it was determined that the extracts inhibited the preformed biofilm by 54%, 62%, and 56%, and 61% at 1X and 2X MIC, respectively, and the MBRC₅₀ value was 125 µg/mL. It was determined that the extracts showed an additive effect (FIC=0.62) against *E.coli*.

Conclusions: Although the tested extracts have moderate and low antimicrobial effects, they have well effects both in preventing the formation of biofilm and in removing the formed biofilm

Keywords: *Vincetoxicum canescens* subsp. *pedunculata*, *Vincetoxicum fuscatum* subsp. *fuscatum*, Seed, Antimicrobial, Antibiofilm, Synergy test

* Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi, 2022; 12 (3): 628-636

DOI: 10.31020/mutfd.1131757

e-ISSN: 1309-8004, ISSN 1309-761X

Geliş Tarihi – Received: 24 Haziran 2022; Kabul Tarihi - Accepted: 09 Ağustos 2022

İletişim - Correspondence Author: Zehra Öksüz <zehraoksuz@gmail.com>

Giriş

Vincetoxicum N.M. Wolf cinsi Apocynaceae familyasına ait (Subfamilya: Asclepiadoideae)¹ yaklaşık 100 türü içermektedir. Cins ait türler Avrupa'dan Akdeniz'e ve Doğu Asya'ya kadar yayılış göstermektedir.² Cinsin bazı türleri geleneksel olarak nevroz, sıtma, skrofula, ateş, uyuz,³ eksternal kanserler, incinme ve yara tedavisinde kullanılmaktadır.⁴ Cins Türkiye'de 8 tür ve 10 taksonla temsil edilmekte olup bunların 3'ü endemiktir.⁵ *V. hirundinaria* Medik. türü Avrupa'da ekspektoran,^{6,7} diüretik, emetik,^{1,7,8} antitümöral, laksatif ve diaforetik ajan¹ olarak geleneksel tedavide kullanılmakta olup, kökleri veteriner hekimlikte içerisinde ödeminde olduğu çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.¹ Fransa'da "dompte-venin" olarak bilinmekte ve geleneksel tedavide emetik ve ekspektorant etkisi nedeniyle⁷ ve İtalya'da kökleri ve tüm bitki infüzyonu ve dekoksyonu zehirlenmelerde antidot⁹ olarak kullanılmaktadır. Türkiye'de "Kırlangıçkuyruğu ve Panzehir otu" adı ile bilinmekte olup köklerin emetik etkisi bildirilmiştir.¹⁰ Ayrıca homeopatik preparat Engystol'ün bileşimine katılmaktadır.¹¹ *V. canescens* subsp. *canescens* (Willd.) Decne. türü Tunceli (Ovacık) yöresinde "zehir otu"¹² olarak bilinir. Türün ezilmiş meyve ve yaprakları haricen fungal enfeksiyonların tedavisinde kullanılır.^{12,13} Buna ek olarak Doğu Anadolu Bölgesi'nde *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. toleum* Boiss. türleri "Zilasur" olarak bilinir ve dövülmüş halde uyuz tedavisinde haricen kullanılır.¹³ *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* (Hornem.) Reichb. türü ise Türkiye'de "gâvur biberi" olarak bilinmektedir.^{14,15} Cins ait türler üzerinde yapılan önceki çalışmalarda antibakteriyel, antifungal,^{16,17} antioksidan,¹⁸ antidiyariyel, antispazmodik,¹⁹ antilayşmanyal, antimalaryal⁴ ve sitotoksik²⁰ aktiviteleri bildirilmiştir. *Vincetoxicum* cinsine ait türlerin tohumları üzerinde yapılan fitokimyasal araştırma çalışmalarında tohumlarının yağ asidi, sterol, α -tokoferol, β -tokotrienol, aminoasitler ve mineraller içerdiği ayrıca toplam fenol ve flavonoid içerdiği ve antioksidan aktivitelerinin olduğu tespit edilmiştir.¹⁸

Mikroorganizmalar, dünyanın her yerinde tedavisi zor enfeksiyonlara neden olarak hayati tehlike oluşturabilir. Özellikle son dönemde Dünya'da ve ülkemizde antibiyotiklere karşı gelişen direnç ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir.²¹ Dünya Sağlık Örgütü, antimikrobiyal direncin, insanlığın karşı karşıya olduğu en büyük 10 küresel halk sağlığı tehdidinden birisi olduğunu ilan etmiştir.²² Günümüzde, antimikrobiyal dirençli enfeksiyonlar yılda en az 700.000 ölüme neden olmaktadır. Nisan 2019'da Dünya Sağlık Örgütü, herhangi bir önlem alınmazsa bu rakamın 2050 yılına kadar yılda 10 milyona ulaşacağı ve insanlarda önde gelen ölüm nedeni olan diyabet, kalp hastalığı ve kanseri geride bırakacağı tahmin etmektedir.²³ Son dönemde, çeşitli enfeksiyon hastalıklarının patogeneğinde mikroorganizmaların planktonik formlarının yanı sıra mikrobiyal biyofilmlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Biyofilmler, istilacı bakterileri fagositlerin ve kompleman sisteminin bozulmuş aktivasyonu yoluyla konakçının bağışıklık sisteminden korur. Planktonik bakterilere kıyasla biyofilm oluşturma yeteneğine sahip bakteriler antibiyotiklere karşı 1000 kat daha dirençlidir bu nedenle biyofilm kaynaklı bakteriyel enfeksiyonlar tüm dünyada insan sağlığını tehdit eden büyük bir sorundur.²⁴ Biyofilm mikroorganizmaların kendi ürettikleri organik ekzopolisakkarit yapılar aracılığıyla, canlı veya cansız bir yüzeye tutunmaları sonrasında oluşturdukları mikro-ekosistem olarak tanımlanabilir.²⁵ *P. aeruginosa*, *S. aureus* gibi çoğu mikroorganizma stresli ortamlarda hayatta kalmak ve virülansını arttırmak için biyofilm oluşturur.^{26,27} Mikrobiyal biyofilm oluşumu, uzun yıllardır araştırılmakta olup, günümüzde pek çok bakteriyel enfeksiyonda majör etkenlerden birisi olarak kabul edilmektedir. Biyofilm ilişkili mikroorganizmalar, kistik fibroz hastalarında kronik akciğer enfeksiyonu, endokardit, idrar yolu enfeksiyonların, osteomyelit, kronik prostatit, sinüzit, periodontitis, orta kulak enfeksiyonları ve çeşitli hastane enfeksiyonları gibi birçok enfeksiyona neden olabilir.^{25,28} Aynı zamanda implantlar, intravenöz kateterler, kalp kapakçıkları, kontakt lensler gibi farklı biyomateriyaller üzerinde oluşan biyofilmler sonucu gelişen enfeksiyonlar da ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır.²⁹ Bu nedenle biyofilm üretebilen mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonları ortadan kaldırmak için yeni terapötik ajanların keşfine yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Bu çalışmada; Türkiye’de doğal olarak yetişen ve biri endemik olan iki *Vincetoxicum* taksonunun [*V. canescens* (Willd.) Decne. subsp. *pedunculata* Browicz (endemik) (VC) ve *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* (VF)] tohumlarından elde edilen etanollü ekstrelerin antibakteriyal, antifungal ve antibiyofilm aktivitelerinin ve sinerjik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Ekstre Hazırlama

Çalışılan bitki materyalleri Türkiye’nin farklı bölgelerindeki doğal habitatlarından toplanmış ve Dr. Seveda Güzel Kara (Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı) ve Dr. Ahmet İlçim (Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından teşhis edilmiştir. (Toplama bilgileri, *V. canescens* subsp. *pedunculata*: Dinar-Afyon, MKUH 1284; *V. fuscatum* subsp. *fuscatum*: Pınarbaşı-Kayseri, MKUH 1315). Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş tohumlar, oda sıcaklığında etanol [20 mL etanol/1g numune, %96] ile masere edilmiş (x3) ve Whatman Grade No.1 filtre kağıdı kullanılarak süzölmüştür. Daha sonra solvent, bir vakumlu buharlaştırıcı (Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Germany) kullanılarak buharlaştırılmış ve elde edilen etanollü ekstreler kullanılabildiği kadar karanlıkta 4°C’de saklanmıştır.³⁰ (Ekstre verimleri: VC: %25,6 ve VF: %26,4)

Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi

Antimikrobiyal Aktivite Testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testi, daha önce tanımlandığı gibi standart mikrodilüsyon seri seyreltme yöntemine göre gerçekleştirilmiştir.³¹ Bu çalışmaya *Escherichia coli* ATCC 35150, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 100031 olmak üzere 5 referans bakteri suşu ve *Candida albicans* ATCC 90028 and *Candida parapsilosis* ATCC 90018 olmak üzere 2 referans maya suşu dahil edilmiştir.

Mikroorganizma süspansiyon konsantrasyonları; mayalar için 28°C’de 24 saat boyunca Sabouraud dekstroz agarda (Merck, Almanya) ve bakteriler için 37°C’de 24 saat boyunca Mueller-Hinton agardaki (Merck, Almanya) stok kültürlerden McFarland 0,5 (5×10^5 CFU/mL) olarak ayarlandı. Ekstrelerin stok çözeltileri, 1000 µg/mL dimetil sülfoksitle (DMSO) hazırlandı. Mikrodilüsyon testi için, 100 µL sıvı besiyeri [mayalar için Sabouraud dekstroz broth (Merck, Almanya), bakteriler için Mueller-Hinton broth (Merck, Almanya)] 96’lık mikropolanın her bir kuyusuna dağıtıldı. Ekstrelerin stok solüsyonundan 100 µL birinci kuyucuklara ilave edildi ve iki kat seyreltmeler yapıldı. Daha sonra her kuyucuğa McFarland 0,5 ayarlı stok kültürden 5 µL bakteri veya maya süspansiyonu eklendi. Ortam kontrol kuyusu oluşturmak için bazı kuyulara mikroorganizma süspansiyonu eklenmezken, mikrobiyal büyüme kontrolü için test edilen ekstreler olmadan bazı kuyulara sadece 5 µL maya veya bakteri süspansiyonu eklendi. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) görsel olarak ve 630 nm optik yoğunlukta (OD) bir mikropolaka spektrofotometresi (BioTek Inc., ABD) kullanılarak belirlendi. Bakteriler için ampisilin (Sigma, ABD) ve mayalar için flukonazol (Sigma, ABD) referans ilaç olarak kullanıldı. Ayrıca DMSO’nun çalışmaya dahil edilen mikroorganizmaların büyümesine etkisinin olmadığı test edildi ve tüm deneyler 2 kez tekrarlandı.

Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

Tüm biyofilm testleri *P. aeruginosa*’nın biyofilmi üzerinde yapıldı. Bu nedenle *P. aeruginosa*’nın biyofilm oluşum kapasitesi, standart kristal viyole (CV) boyama yöntemi modifiye edilerek belirlendi.³² Kısaca, 100 µL MHB 96’lık mikropolalara aktarıldı ve McFarland 0,5’e ayarlı 10 µL mikroorganizma hücre süspansiyonları eklendi. Mikropolalar 37°C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklardan hücre süspansiyonları nazikçe aspire edildi ve steril fosfat tamponlu salin (PBS) ile üç kez yıkandı. Ardından

kuyucuklardaki biyofilmler 150 µL metanol ile 15 dakika fikse edildi. Süre sonunda kuyucuklardaki metanol aspire edildi ve mikrolaka havada kurutuldu. Daha sonra mikrolaka kuyularına 150 µL %0,5 CV solüsyonu eklendi ve 25°C'de 15 dakika inkübe edildi. Kuyulardaki CV solüsyonu aspire edildi, ardından PBS ile yıkandı ve mikrolaka kuyuları havada kurutuldu. Son aşamada mikrolaka kuyularına 150 µL %95 etanol eklendi ve 15 dakika bekletildi. Biyofilm oluşumu, bir mikrolaka spektrofotometresi (BioTek Inc., ABD) kullanılarak 550 nm'de OD'da absorbans ölçülerek belirlendi. Negatif kontrol olarak mikroorganizma inokulumu olmayan kuyucukların OD değerleri kullanıldı. Tüm testler iki kopya halinde yapıldı.

Biyofilm İnhibisyon Testi

Ekstrelerin biyofilm önleme deneyi CV boyama deneyinde küçük modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir.³³ Kısaca, mikrolaka kuyularında ekstrelerin alt-MİK'lerinde (0,5X ve 0,25X MİK) seri seyreltmeler yapıldı. Daha sonra McFarland 0,5'e (5x10⁵ CFU/mL) ayarlanmış *P. aeruginosa* süspansiyonu 96 mikrolakanın kuyucuklarına ekildi ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Ardından, test edilen ekstrelerin *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu engelleme potansiyeli, "Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi" bölümünde bahsedilen CV boyama deneyi adımları izlenerek belirlendi. PBS negatif kontrol olarak kullanıldı. Ekstrelerin biyofilm oluşumu üzerindeki etkileri, bir mikrolaka spektrofotometresi (BioTek Inc., ABD) kullanılarak 550 nm'de kuyuların OD'si ölçülerek değerlendirildi. Biyofilm oluşumunun en az %50 oranında inhibe edildiği en düşük ekstre konsantrasyonu, minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyonu (MBIC₅₀) olarak tanımlandı.

Biyofilm-Eradikasyon Testi

Ekstrelerin önceden oluşturulmuş biyofilm üzerindeki etkisi, CV boyama testinde küçük modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir.³³ Kısaca, 100 µL MHB medium ve McFarland 0,5'e (5x10⁵ CFU/mL) ayarlanmış 5 µL *P. aeruginosa* süspansiyonu, 96 kuyucuklu mikrolakanın her bir kuyusuna ekildi ve 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, süpernatantlar nazikçe aspire edildi ve her bir kuyucuğa 1X ve 2X MİK konsantrasyonlarına hazırlanan her ekstre 100 µL ilave edildi. Mikrolakalar tekrar 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra ekstrelerin *P. aeruginosa* tarafından önceden oluşturulmuş biyofilmi yok etme potansiyeli "Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi" bölümünde bahsedilen CV boyama testi adımları izlenerek belirlendi. Negatif kontrol olarak PBS kullanıldı. Ekstrelerin önceden oluşturulmuş biyofilme etkileri, bir mikrolaka spektrofotometresi (BioTek Inc., ABD) kullanılarak 550 nm'de kuyuların OD'si ölçülerek değerlendirildi. Önceden oluşturulmuş biyofilmin en az %50'sini yok etmek için gereken ekstrelerin en düşük konsantrasyonu, minimum biyofilm azaltma konsantrasyonu (MBRC₅₀) olarak tanımlandı.

Mikrodilüsyon Dama Tahtası Sinerji Testi

E. coli'ye karşı ekstreler arasındaki sinerjiyi değerlendirmek için mikrodilüsyon dama tahtası test yöntemi kullanıldı.³⁴ Dama tahtası sinerji testi, 96 kuyulu mikrolakalarda iki kopya halinde yapıldı. Pozitif kontrol olarak ekstre içermeyen kuyucuklar hazırlandı. Kısaca VC ekstresinin seri dilüsyonları (250-1,95 µg/mL) soldan sağa doğru mikrolakanın ilk sekiz kuyucuğuna dağıtıldı. Başka bir mikrolakanın ilk sekiz kuyucuğuna ise yukarıdan aşağıya doğru VF ekstresinin seri dilüsyonları (250-1,95 µg/mL) dağıtıldı. Kullanılan bileşiklerin konsantrasyon aralığı MİK değerlerine göre belirlendi (Tablo 1). İki mikrolakanın içeriği başka bir mikrolakada birleştirildi. Her kuyucuğa 5x10⁵ CFU/mL yoğunlukta hazırlanan bakteri inokulumu eklendi ve mikrolakalar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Dama tahtası testinin değerlendirilmesi, fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) indeksine göre yapıldı. FİK indeksi şu şekilde yorumlanmıştır: FİK ≤0,5, sinerji; FİK >0,5 ve <1, indifferans; FİK >1 ve ≤4, aditif; ve ≥4, antagonist.³⁴

FİK indeksi aşağıda verilen denkleme göre hesaplanmıştır;

$$A/MİKA + B/MİKB = FİKA + FİKB = FİK \text{ indeks,}$$

(A ve B, kombinasyondaki A ve B ekstrenin MİK'lerini; MİKA ve MİKB, yalnızca A ve yalnızca B ekstresinin MİK'lerini; FİKA ve FİKB ise ekstre A ve ekstre B'nin FİK'lerini gösterir)

Bulgular

Antibakteriyel Aktivite

Test edilen ekstrelerin 62,5 ila 250 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda çalışmaya dahil edilen bakteri ve mayaların büyümesini inhibe ettiği gözlenmiştir (Tablo 1). VC ekstresinin *K. pneumoniae* ve *E. faecalis* üzerindeki antimikrobiyal etkinliğinin VF ekstresinden daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca her iki ekstre *E. coli*'ye karşı benzer antimikrobiyal etkinlik göstermiştir (62,5 µg/mL). Mayalarda değerlendirildiğinde her iki ekstrenin de *C. albicans*'a kıyasla *C. parapsilosis*'e karşı daha etkin olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında, ekstrelerin bakteri ve mayalar üzerine antimikrobiyal etkinliği açısından farklarının olmadığı da belirlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Test edilen ekstrelerin MİK değerleri ve mikrobiyal suşlara karşı referans ilaçlar (µg/mL).

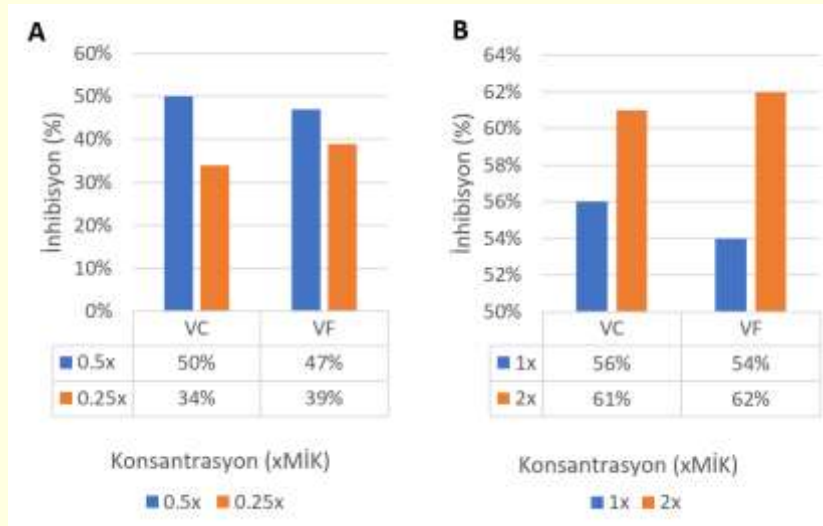
Ekstreler/ Referans antimikrobiyaller	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 100031	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 35150	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018
VC	62,5	125	125	62,5	62,5	125	62,5
VF	125	125	125	62,5	250	125	62,5
Ampicillin	*	31,25	*	3,90	*	-	-
Fluconazole	-	-	-	-	-	*	*

-Test edilmedi; * Test edilen tüm konsantrasyonlarda etkin

-VC: *V. canescens* subsp. *pedunculata*, VF: *V. fuscum* subsp. *fuscum*

Biyofilm İnhibisyon ve Eradikasyon Aktivitesi

Biyofilm önleme testi, VC ve VF ekstrelerinin biyofilm oluşumunu 0,5X ve 0,25X MİK'de sırasıyla %47, %39 ve %50, %34 oranında engellediğini belirledi (Şekil 1A). Bu nedenle her iki ekstrenin MBIC₅₀ değeri 62,5 µg/mL'dir (Tablo 2). Ayrıca iki ekstrenin biyofilm önleme potansiyellerinin birbirine yakın olduğu da tespit edilmiştir.



Şekil 1. (A) 0.5X ve 0.25X konsantrasyonlarda VC ve VF tohum ekstreleri tarafından *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunun inhibisyonu (%). **(B)** 1X ve 2X konsantrasyonlarda VC ve VF tohum ekstrelerinin önceden oluşturulmuş biyofilm inhibisyonu (%). (VC: *V. canescens* subsp. *pedunculata*, VF: *V. fuscum* subsp. *fuscum*).

Biyofilm eradikasyon testi, *P. aeruginosa* biyofilmleri 24 saat süreyle oluştuktan sonra VC ve VF ekstralarının biyofilm oluşumunu 1X ve 2X MİK'de sırasıyla %54, %62 ve %56, %61 oranında engellediğini belirledi (**Şekil 1B**). Bu nedenle her iki ekstrenin MBRC₅₀'si 125 µg/mL'dir (**Tablo 2**). Ekstrelerin biyofilm önleme testine benzer şekilde önceden oluşmuş biyofilmi inhibe etme potansiyelleri de birbirine yakın bulunmuştur.

Tablo 2. VC ve VF tohum ekstralarının *P. aeruginosa*'ya karşı antibiyofilm aktiviteleri

Ekstreler	MİK (µg/mL)	MBIC ₅₀ (µg/mL)	MBRC ₅₀ (µg/mL)
VC	125	62,5	125
VF	125	62,5	125

VC: *V. canescens* subsp. *pedunculata*, VF: *V. fuscum* subsp. *fuscum*

Sinerjik Etki

Çalışılan ekstralar *E. coli* üzerine 62,5 µg/mL MİK konsantrasyonda antimikrobiyal etkinlik göstermiştir (**Tablo 1**). Bu nedenle ekstraların *E. coli*'ye karşı sinerjik etkilerine mikrodilüsyon dama tahtası testi ile bakılmış ve FİK değeri belirlenmiştir. Sinerji testine göre, VC ve VF ekstraları arasında aditif (FİK=0,62) etki olduğu tespit edilmiştir.

Tartışma

Bu araştırma Türkiye'de doğal olarak yetişen biri endemik iki *Vincetoxicum* taksonunun tohumlarından elde edilen etanol ekstralarının antibiyofilm aktivitesi ve sinerjik etkileri üzerine yapılmış ilk bilimsel çalışma olup *E. coli* ATCC 35150, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 29213, *K. pneumoniae* ATCC 100031 referans bakteri suşları ve *C. albicans* ATCC 90028 and *C. parapsilosis* ATCC 90018 referans maya suşlarına karşı da ilk kez antimikrobiyal aktiviteleri için araştırılmıştır.

Literatür taramalarında, *Vincetoxicum* cinsine ait olan ve dünya genelinde yayılış gösteren bazı taksonların farklı kısımları üzerine yapılmış çeşitli antimikrobiyal aktivite çalışmalarının olduğu gözlenmiştir.^{16,17,35-37} *V. pumilum* Decne. türünün metanol ekstresinin *C. albicans*'a karşı belirgin etkili olduğu, bakteri suşlarına karşı ise etkisiz olduğu görülmüştür.³⁷ *V. stocksii* türünün metanol ekstresinin etil asetat, hekzan, bütanol, kloroform ve su fraksiyonlarının *B. subtilis* ve *C. albicans*'a karşı belirgin aktiviteli olduğu, *E. coli*'ye karşı ılımlı aktivite gösterdiği ve *S. aureus* karşı ise etkisiz olduğu tespit edilmiştir.³⁵ *V. rossicum* türünün kök, taze yaprak ve olgun meyvelerinin etanol ekstralarının antimikrobiyal etkinliğinin olduğu ve ayrıca köklerin yapraklardan daha aktif olduğu gözlenmiştir.¹⁶

Çalışma grubumuz tarafından Türkiye'de doğal olarak yetişen bazı *Vincetoxicum* taksonlarının çeşitli kısımları üzerinde araştırmalar yapılmış olup^{17,18,36,38,39} önceki çalışmalarda *V. canescens* subsp. *canescens*, *V. canescens* subsp. *pedunculata*, *V. fuscum* subsp. *fuscum*, *V. fuscum* subsp. *boissieri* ve *V. parviflorum* türlerinin kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen diklorometan, diklorometan: metanol (1:1), metanol ve total etanol ekstralarının *A. fumigatus*'a karşı aktivitesi araştırılmış ve *V. parviflorum*'un kök ve toprak üstü kısımlarından ve *V. canescens* subsp. *canescens*'in köklerinden elde edilen diklorometanlı ekstralarının yüksek etkili olduğu bulunmuştur.³⁸ Ayrıca bu taksonların kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen etanol ekstraları *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *A. baumannii*, *A. hydrophila*, *M. tuberculosis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* karşı test edilmiş; ekstralar *A. baumannii*'ye karşı referans ilaç Ampisilinden daha etkili iken antifungal aktiviteleri referans ilaç Flukonazole kadar yüksek bulunmamıştır.¹⁷ Bazı *Vincetoxicum* taksonlarının tohum zarflarından elde edilen etanol ekstralarının aynı suşlar için test edildiği başka bir çalışmamızda ise benzer şekilde *A. baumannii*'ye karşı Ampisilinden daha etkili bulunmuştur.³⁶ *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* tohumlarının etanol ve hekzan ekstraları aynı suşlar için test edildiği bir diğer çalışmamızda ise bakteri ve fungusların büyümesini inhibe ettiği gözlenmiştir. Dahası etanol ekstraları hekzan ekstralarına göre daha etkili bulunmuştur.³⁹ Bu nedenle mevcut araştırmada çalışılacak türlerin tohumlarının

etanol ekstralarının elde edilerek aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Mevcut çalışmada test edilen suşlara karşı kullanılan ekstraların antimikrobiyal etkisinin olduğu görülmüş olup çalışma sonuçlarımızın önceki araştırmalarımızla ve diğer literatür verileri ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Sinerji testi verilerimiz VC ve VF ekstralarının *E.coli*'ye karşı aditif etkili olduğunu göstermiştir. Bu durum, VC ve VF ekstralarının *E.coli* üzerindeki antimikrobiyal etkisinin, ayrı ayrı kullanıldığında birlikte kullanımından farklı olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda ekstraların *P. aeruginosa*'nın hem biyofilm oluşumunu inhibe etme hem de önceden oluşmuş biyofilm üzerine etkisine bakılmıştır. Her iki ekstrenin biyofilm önleme ve önceden oluşmuş biyofilmi inhibe etme potansiyeli birbirine yakın bulunmuştur. Ancak genel olarak çalışılan ekstralar antibiyofilm etkinliği açısından karşılaştırıldığında önceden oluşmuş biyofilmi inhibe etme potansiyellerinin, biyofilm oluşumunu engelleme potansiyellerinden daha yüksek olduğu görülmüştür.

Antibiyofilm çalışmalarına dahil ettiğimiz *P. aeruginosa* özellikle kistik fibröz hastalarının akciğerlerinde biyofilm oluşturabilen fırsatçı bir mikroorganizmadır. Bu bakteri bir dizi virülans faktörünü, biyofilm varlığı için çok önemli olan Quorum sensing (QS) regülatör sisteminin kontrolü altında üretebilmektedir. Bundan dolayı antibiyotik direnci geliştirebilir ve eradikasyonu zordur.⁴⁰ Çalışmamızda özellikle VC ve VF ekstralarının sub-MİK'de (0,5X), sırasıyla %50 ve %47 oranında *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu inhibe etmesi dikkat çekicidir.

Son derece heterojen bir yapıya sahip olan biyofilm enfeksiyonlarının önlenmesi için mevcut antimikrobiyaller yeterli değildir. Antibiyotik direncinin her geçen gün artması, daha fazla ölüme ve hastaneye yatışa neden olmaktadır. Bu enfeksiyonlar hasta güvenliği yanında ekonomik maliyet sorunu da oluşturmaktadır.^{21,23} Bu nedenle yeni antimikrobiyallerin geliştirilmesi, antimikrobiyal dirençli patojenlerin artmasından kaynaklanan küresel zorluk nedeniyle öncelikli hale gelmiştir. Sonuç olarak; son yıllarda kolay ulaşılabilir olması, maliyetinin düşük olması ve direnç geliştirmemesi gibi nedenlerle doğal kaynaklı materyallerin antimikrobiyal aktivitesine yönelik araştırmalar artmıştır. Literatür taraması VC ve VP taksonlarının tohumlarının antibiyofilm aktivitesi ve sinerjik etkilerinin ilk kez bu çalışmada gösterildiğini doğrulamaktadır. Antibiyofilm etkinliği açısından dikkat çekici olan VF ve VC tohum ekstralarının antimikrobiyal aktivite potansiyellerinin gösterilmesi için farklı suşların dahil edildiği araştırmaların yapılması uygun olacaktır. Çalışmamız bu cins üzerinde yapılan ilk antibiyofilm araştırma çalışması olması nedeniyle *Vincetoxicum* cinsine ait diğer türlerin araştırılmasına yönelik ön veriler sunmaktadır. Ayrıca sonraki araştırmalarda etkiden sorumlu bileşiklerin, etki mekanizmalarının, hayvan deneylerinin ve toksisite testlerinin de yapılması ile bu taksonların antimikrobiyal ajan olarak enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanımlarının uygun olup olmayacağını değerlendirilmesini amaçlayan yeni araştırmalara öncülük edecektir.

Bilgi

Yazarların bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır. Bu çalışma için herhangi bir kurumdan mali destek alınmamıştır.

Bitki örneklerinin teşhisinde katkılarından dolayı Dr. Ahmet İlçim 'e teşekkür ederiz.

Araştırmacı Katkı Oranı Beyanı

Zehra Öksüz: Fikir / kavram, tasarım, denetleme, veri toplama ve işleme, analiz ve yorum, kaynak taraması, makale yazımı, eleştirel inceleme.

Sevda Güzel Kara: Fikir / kavram, tasarım, denetleme, veri toplama ve işleme, analiz ve yorum, kaynak taraması, makale yazımı, eleştirel inceleme, malzemeler.

Kaynaklar

- DiTommaso A, Lawlor FM, Darbyshire SJ. The biology of invasive alien plants in Canada 2. *Cynanchum rossicum* (Kleopow) Borhidi (= *Vincetoxicum rossicum* (Kleopow) Barbar.) and *Cynanchum louseae* (L.) Kartesz&Gandhi (= *Vincetoxicum nigrum* (L.) Moench). Can J Plant Sci 2004;85(1):243-263.
- Güven S, et al. Pollinarium morphology of *Vincetoxicum* (Apocynaceae: Asclepiadoideae) in Turkey. Phytotaxa 2015;230(1):22-38
- Sliumpaite I, et al. Antioxidant properties and phenolic composition of swallowwort (*Vincetoxicum lutea* L.) leaves. Ind Crops Prod 2013;45:74-82.
- Mansoor A, et al. Antiprotozoal activities of *Vincetoxicum stocksii* and *Carum copticum*. Bangladesh J Pharmacol 2011;6(1):51-54.
- Browicz K. *Vincetoxicum* N.M. Wolf. In: Davis PH, editor, Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh, Scotland. 1978. pp:163-173
- Pavela R. Antifeedant activity of plant extracts on *Leptinotarsa decemlineata* Say. and *Spodoptera littoralis* Bois. larvae. Ind Crops Prod 2010;32(3):213-219.
- Lavault M, Richomme P, Bruneton J. New phenanthroindolizidine N-oxides alkaloids isolated from *Vincetoxicum hirundinaria* Medic. Pharm Acta Helv 1994;68(4):225-227
- Lavault M, Richomme P, Bruneton J. Acetophenones and new pregnane glycosides from the roots of *Vincetoxicum hirundinaria*. Fitoterapia 1999;70(2):216-220.
- Coassini-Lokar L, Poldini L. Herbal remedies in the traditional medicine of the Venezia Giulia Region (North East Italy). J Ethnopharmacol. 1988;22(3):231-279.
- Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün. İlaveli 2. Baskı; İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul, Türkiye 1984.
- Slapšytė G, et al. Genotoxic properties of *Betonica officinalis*, *Gratiola officinalis*, *Vincetoxicum luteum* and *Vincetoxicum hirundinaria* extracts. Food and Chemical Toxicology. 2019;134:110815
- Tuzlacı E, Dogan A. Turkish folk medicinal plants, IX: Ovacık (Tunceli). Marmara Pharm J 2010;14:136-143
- Altundag E, Ozturk M. Ethnomedicinal studies on the plant resources of East Anatolia, Turkey. Procedia Soc Behav Sci 2011;19:756-777.
- Eker İ, Vural M, Aslan S. Ankara İli'nin Damarlı bitki çeşitliliği ve korumada öncelikli Taksonları. Bağbahçe Bilim Dergisi 2015;2(3):57-114
- Koyuncu O, Sezer O. Altıntaş (Kütahya) Turba (Torf) Ocağı Ve Çevresinin Damarlı Bitkiler Florası. IJABES 2019;1(1): 6-21. -15
- Mogg C, et al. Test of the antibiotic properties of the invasive vine *Vincetoxicum rossicum* against bacteria, fungi and insects. Biochem Syst Ecol 2008;36:383-391.
- Guzel S, et al. Evaluation of antimicrobial activity of five *Vincetoxicum* taxa growing in Turkey. Mamar Pharm J 2018;22(3):365-373.
- S. Guzel. Fatty acid, sterol, and tocol compositions; amino acid, mineral, total phenolic, and flavonoid contents; and antioxidant activity of seeds of two *Vincetoxicum* taxa. Chemistry of Natural Compounds, 2020;56(2):202-206.
- Shah AJ, et al. Antidiarrheal and antispasmodic activities of *Vincetoxicum stocksii* are mediated through calcium channel blockade. Bangladesh J. Pharmacol 2011;6:46
- Staerk D, et al. *In vitro* cytotoxic activity of phenanthroindolizidine alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum* and *Tylophora tanakae* against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells. J Nat Prod 2002;65:1299-1302
- Akalın H. Antimikrobiyal Direnç Ve Önleme Politikaları. Ankem Derg 2011;25(3):190-195,
- Antimicrobial resistance. No time to wait: securing the future from drug-resistant infections. No action today, no cure tomorrow. 2022. Available from: <https://openwho.org/channels/amr> Accessed June 10, 2022.
- Morrison L, Zembower TR. Antimicrobial Resistance. Gastrointest Endosc Clin N Am 2020;30(4):619-635.
- Fernández L, et al. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. Drug Resist Updat 2011;14:1–21.
- Del Pozo JL. Biofilm-related disease. Expert Rev Anti Infect Ther 2018;16(1):51-65.
- Alhede M, et al. Phenotypes of non-attached *Pseudomonas aeruginosa* aggregates resemble surface attached biofilm. PloS One 2011;6:27943
- Haaber J, et al. Planktonic aggregates of *Staphylococcus aureus* protect against common antibiotics. PloS One 2012;7:41075.
- Ibberson, CB, Whiteley, M. The social life of microbes in chronic infection. Curr. Opin. Microbiol 2020;53:44–50.
- Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. J Hosp Infect 2006;64(4):313-25.
- Güzel S, Ülger M, Kahraman A. Chemical composition and some biological activities of *Salvia longipedicellata* Hedge mericarps. Chemistry of Natural Compounds 2020;56(5):788-792

31. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practice. Clin Infect Dis 1998;26:973–80.
32. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. J Vis Exp 2011;47:2437
33. Zhong H, et al. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Temporin-GHc and Temporin-GHd Against Cariogenic Bacteria, Streptococcus mutans. Front Microbiol 2019;10:2854.
34. Moody J. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth microdilution methods. In: Garcia LS editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington, DC: ASM Press; 2010. pp 5.12.11-5.12.23.
35. Zaidi MA, Crow JSA. Biologically active traditional medicinal herbs from Balochistan, Pakistan J Ethnopharmacol 2005;96:331-334
36. Guzel S, Ulger M, Kokdil G. Anti(myco)bacterial and antifungal activities of seed pods of four *Vincetoxicum* taxa growing in Turkey. International Journal of Scientific and Technological Research 2018;4(3):27-38.
37. Bazzaz F, Haririzadeh G. Screening of Iranian plants for antimicrobial activity. Pharm Biol 2003;41(8):573-583
38. Guzel S, Pavela R, Kokdil G. Evaluation of antifungal effect of different polarity extracts from five *Vincetoxicum* taxa against *Aspergillus fumigatus*. International Anatolian Academic Online Journal/Health Science 2015;3(2):1-9.
39. Ülger M, et al. *Vincetoxicum canescens* subsp. *canescens* ve *Vincetoxicum canescens* subsp. *pedunculata* Tohumlarının Antimikrobiyal ve Antiproliferatif Aktiviteleri. Lokman Hekim Dergisi, 2019;9:367-375.
40. Ben Haj Khalifa A, et al. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. Annales de biologie clinique 2011;69(4):393–403.
41. Hengzhuang W, et al. *In vivo* pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. Antimicrobial Agents Chemotherapy 2012;56:2683-90