



Bir Flavonoid Olan Gossypin'in, Standard Bakteri ve Maya Suşları Üzerindeki Antibakteriyel, Antifungal, Antibiyofilm, Antiadherent ve Antiinvazif Aktivitelerinin İn vitro Olarak Araştırılması

Murat Karameşe¹, İrfan Çınar², Didem Özgür¹, Yalçın Dicle³

¹ Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars, Türkiye

² Kastamonu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Kastamonu, Türkiye

³ Mardin Artuklu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mardin, Türkiye

Geliş: 05.05.2023; Revizyon: 31.08.2023; Kabul Tarihi: 04.09.2023

Öz

Amaç: Planlanan çalışmamızda Hibiscus vitifolius isimli bitkinin majör komponentlerinden biri olan gossypin isimli etken maddenin mikroorganizmalar ve onların virülans özellikleri (biyofilm oluşturma, adezyon ve invazyon yeteneği gibi) üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmamızda, gossypin isimli maddenin 5 farklı türdeki mikroorganizmalar (2 gram pozitif bakteri, 2 gram negatif bakteri ve 1 maya) üzerine olan antibakteriyel ve antifungal etkinlikleri bir mikrodilüsyon yöntemi olan Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi (SMD) ile tespit edilmiştir. Ardından, biyofilm oluşumu; kristal viyole ve MTT testleri uygulanmıştır. Gossypin'in antibiyofilm aktivitesi mikropilaka yöntemi ile tespit edilip, MTT deneyleri ile doğrulanmıştır. Son olarak ise, gossypin'in antiinvazif etkinliğini ölçmek amacıyla Adherent-Invasive Escherichia coli bakterisi ile Caco-2 insan kolon hücreleri enfekte edilerek, AEIC suşunun invazyonu indüklenmiş ve etken maddenin invazyon üzerine olan inhibe edici etkisi araştırılmıştır.

Sonuç: Elde edilen sonuçlara göre, gossypin'in doza bağlı olarak antibakteriyel, antifungal ve antibiyofilm etkinliği olduğu saptanmıştır (MİK değerleri 40-80 µg/ml arasındadır). Buna ilave olarak, gossypin dozuna bağlı olarak bakterilerin Caco-2 hücrelerine olan adezyon ve invazyon süreçleri üzerine etkili olduğu saptanmıştır. 160 µg/ml gossypin uygulaması bakteri adezyonunu %67 oranına kadar ve bakteri invazyonunu %38 oranına kadar düşürmektedir. Yapılan in-vitro çalışmalar sonucunda gossypin'in IC50 dozunun 28,20 µg/ml olduğu tespit edilmiştir.

Tartışma: Elde edilen veriler, gossypin'in birden fazla antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu ve bu etkilerin mekanizmalarının saptanması için gelecekte detaylı moleküler çalışmaların yapılması gerektiğini gösterdi.

Anahtar kelimeler: Flavonoidler, Gossypin, Antifungal, Antibakteriyel, Antibiyofilm

DOI: 10.5798/dicletip.1360714

Yazışma Adresi / Correspondence: Murat Karameşe, Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars, Türkiye e-mail: murat_karameşe@hotmail.com

In vitro Investigation of Antibacterial, Antifungal, Antibiofilm, Antiadherent and Antiinvasive Activities of Gossypin, A Flavonoid, on Standard Bacteria and Yeast Strains.

Abstract

Aim: In our study, it was aimed to investigate the effects of gossypin, one of the major components of the plant called *Hibiscus vitifolius*, on microorganisms and their virulence properties (such as biofilm formation, adhesion and invasion ability).

Methods: The antibacterial and antifungal activities of gossypin on 5 different types of microorganisms (2 gram positive bacteria, 2 gram negative bacteria and 1 yeast) were determined by Broth Microdilution Method (BMD), a microdilution method. Then, biofilm formation; crystal violet and MTT Cell Proliferation Assay were applied. Antibiofilm activity of gossypin was determined by microplate method and confirmed by MTT Cell Proliferation Assay. In order to measure the antiinvasive activity of gossypin, the invasion of the AEIC strain was induced by infecting Caco-2 human colon cells with Adherent-Invasive *Escherichia coli* bacteria and the inhibitory effect of the active substance on the invasion was investigated.

Results: According to the obtained results, it was determined that gossypin had a potential antibacterial, antifungal and antibiofilm activity in a dose-dependent manner (between 40-80 µg/ml). In addition, it was determined that gossypin was effective on the adhesion and invasion processes of Adherent-Invasive *Escherichia coli* (AIEC) to Caco-2 cells. Application of 160 µg/ml gossypin reduced bacterial adhesion up to 67% and bacterial invasion up to 38%. As a result of in-vitro studies, the IC50 dose of gossypin was found as 28.20 µg/ml.

Discussion: The obtained data showed that gossypin has more than one antimicrobial activity and future detailed molecular studies should be performed to detect the mechanisms of those effects.

Keywords: Flavonoids, Gossypin, Antifungal, Antibacterial, Antibiofilm.

GİRİŞ

Fenil alaninden türevlenen fenolik bileşiklerden olan flavonoidler, bitkilerin meyve, tohum, çiçek, yaprak ve gövdelerinde bulunan renkli maddelerdir. Bitkilerin yaşamlarında birçok mekanizmada iş gören flavonoidler aynı zamanda birçok ülkenin geleneksel halk tıbbında kullandığı preparatların içerisinde bulunmakta ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Yapılan bilimsel çalışmalara göre flavonoidlerin birçok mikrobiyal ajan üzerinde antibakteriyel, antiviral, antiparaziter ve antifungal etkileri başta olmak üzere birçok koruyucu ve terapötik etkisi tespit edilmiştir¹⁻⁴.

Gossypin (3,5,8,3',4'-pentahidroksi-7-O-glukozil flavon), *Hibiscus vitifolius*'un (ebegümeci otu) majör komponentlerinden biri olup, flavonoidlerin flavon yapı sınıfı içerisinde yer almaktadır. Suda çözünmeyip, seyreltik Potasyum Hidroksit (KOH) veya Dimetil Sülfoksit (DMSO) ile çözünmektedir. Saf halde

oldukça kararsız olup -20°C' de depolanması gerekmektedir⁵. Gossypin başta kanser olmak üzere birkaç hastalığın patogeneğinde yer alan hücrel süreçlerdeki rolünden dolayı etkili bir ajan olarak literatürde yerini almıştır. Bazı kanser çalışmalarında, apoptotik⁶ etkisinin yanı sıra sinyal yolak proteinlerinin ekspresyonunda da önemli role sahiptir⁷. Diğer taraftan, önemli bir doğal ajan olan gossypin'in antiinflamatuvar⁸, antioksidan⁹, antialerjik¹⁰, antitümör¹¹, antinosiseptif¹² ve nöroprotektif¹³ etkileri mevcut literatürde tespit edilmiştir.

Son yıllarda ülkemiz dahil tüm dünyada enfeksiyon hastalıkları başta olmak üzere, birçok hastalığın tedavisi veya önlenmesinde doğal ajanlar tercih edilmektedir. Bu ajanlar ilgili bitkilerden ekstrakte edilmekte, saflaştırılmakta ve etken madde olarak ilgili hastalıkların tedavi ve önlenmesindeki muhtemel rolünün öğrenilebilmesi amacıyla deneysel çalışmalara tabi tutulmaktadır. Literatür taraması yapıldığında;

Epigallocatechin gallate (EGCG), curcumin, resveratrol, Nigella sativa, apigenin ve benzer birçok doğal ajan ile ilgili binlerce bilimsel çalışma görmek mümkündür¹⁴⁻²¹. Ancak gossypin'in tarihi diğer doğal ajanlar kadar eski olmadığından dolayı, hakkında bu kadar detaylı bilgi edinmek mümkün olmamıştır.

Planlanan çalışmamızda Hibiscus vitifolius isimli bitkinin majör komponentlerinden biri olan gossypin isimli etken maddenin mikroorganizmalar ve onların virülans özellikleri (biyofilm oluşturma, adezyon ve invazyon yeteneği gibi) üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Deney Grupları

Çalışmamızda kullanılan standart maya ve bakteri suşları; Candida albicans (ATCC-28367), Escherichia coli (ATCC-25922), Staphylococcus aureus ATCC-29213), Enterococcus faecalis (ATCC-29212), Pseudomonas aeruginosa (ATCC-27853) Adherent-Invasive Escherichia coli LF82 (AIEC) şeklindedir.

Çalışmamızda kullanılan gossypin saf hali ile ticari olarak temin edilmiştir (Sigma, Gossypin CAS Number: 652-78-8). Uygulanan gossypin dozlarının belirlenmesi için literatür desteği alınmıştır^{8,13,22}. Buna ilaveten, MTT deneyi ile gossypin'in IC50 dozu belirlenmiştir. Liyofilize olarak temin edilen gossypin'in çözündürülmesi amacıyla DMSO kullanılmış ve DMSO'nunda bakteri ve mayalar üzerinde olan etkisinin ölçülmesi ve gossypin'in muhtemel etkilerinden ayırt edilebilmesi amacıyla deney gruplarına yalnızca DMSO uygulanan grup eklenmiştir. Çalışmamızda tasarlanan deney grupları; (i) yalnızca DMSO uygulaması, (ii) 0 µg/ml gossypin uygulaması, (iii) 2,5 µg/ml gossypin uygulaması, (iv) 5 µg/ml gossypin uygulaması, (v) 10 µg/ml gossypin uygulaması, (vi) 20 µg/ml gossypin uygulaması, (vii) 40 µg/ml gossypin uygulaması, (viii) 80 µg/ml gossypin

uygulaması ve (ix) 160 µg/ml gossypin uygulaması şeklindedir.

Gossypin'in Antibakteriyel ve Antifungal Aktivitelerinin Tespiti

Gossypin'in Candida albicans, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis ve Pseudomonas aeruginosa isimli mikroorganizmalara karşı Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerini analiz etmek için, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) rehberine göre mikrodilüsyon metodu kullanılmıştır (Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 2014: Twenty-first Informational Supplement. CLSI Document M100-S21. CLSI, Wayne, PA.). Çalışmamızda kullandığımız tüm maya ve bakteri suşların, Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyerine ekimleri yapılmış ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Bir gecelik inkübasyonun ardından, son konsantrasyonu 1x10⁵ kob/ml olarak hazırlanan bakteri ve maya kültürleri, 0 ile 160 µg/ml arasında değişen (0, 20, 40, 80 ve 160 µg/ml) konsantrasyonlarda hazırlanan gossypin muamele edilerek MİK değerleri not edilmiştir.

Gossypin'in Biyofilm Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturup oluşturmadığının tespit edilebilmesi amacıyla, 96-kuyucuklu mikropalakalara yapılan ekimler ve inkübasyon işlemini takiben; %0,1 konsantrasyona sahip kristal viyole boyası her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde pipetlendi. Bu işlemi takiben tüm kuyucuklar PBS ile üç kez yıkandı. Mikropalakalar kurutulduktan sonra, %96 konsantrasyona sahip etanol her kuyucuğa 200 µl olacak şekilde eklendi. Mikropalakaların havayla temasını önlemek için kapakları kapatılıp 15 dakika beklendi ve spektrofotometrede ölçümler 570 nm dalga boyunda yapıldı. Her bir suş için çalışma 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi²³. Elde edilen

Optical Density (OD) değerleri negatif kontrol ile karşılaştırıldı. OD değeri negatif kontrolün üzerinde olan suşlar biyofilm pozitif olarak değerlendirildi. OD değeri ve biyofilm pozitifliği arasındaki ilişkiye dair bilgiler Tablo 1’de sunulmuştur. Hem negatif kontrol hem de suşların OD değerleri tek başına DMSO’nun OD değeri eksiltilecek hesaplandı.

Tablo I: Çalışmamızda test edilen mikroorganizmaların biyofilm üretim düzeyi belirleme kriterleri

OD Değeri	Biyofilm üretim düzeyi
OD ≤ NK	biyofilm negatif
NK < OD ≤ 2*NK	zayıf düzeyde biyofilm
2*NK < OD ≤ 4*NK	orta düzeyde biyofilm
4*NK ≤ OD	orta düzeyde biyofilm

Tablo II: Gossypin dozlarına ait adezyon sonuçları

Deney Grupları	Kontrolle göre % adezyon
Kontrol grubu	100
2.5 µg/ml gossypin uygulaması	98
5 µg/ml gossypin uygulaması	99
10 µg/ml gossypin uygulaması	93
20 µg/ml gossypin uygulaması	85
40 µg/ml gossypin uygulaması	80
80 µg/ml gossypin uygulaması	61
160 µg/ml gossypin uygulaması	67

96 kuyucuklu mikropalakalarda üretilen mikroorganizmaların biyofilm üretim üretmediklerinin kristal viyole boyama tekniği ile tespitinin ardından gossypin uygulaması gerçekleştirilmiştir. İlgili deney kuyucuklarına 0 ile 160 µg/ml arasında değişen dozlarda hazırlanan gossypin’in uygulanmasının ardından 96 kuyucuklu plaka 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiş ve gossypin’in biyofilm miktarında azalmaya sebebiyet verip vermeyeceği MTT deneyi ile kontrol edilmiştir.

Biyofilm inhibisyon deneyinin yapılış amacı, gossypin’in maya ve bakteri suşlarının sahip olduğu biyofilm yetenekleri üzerine olan muhtemel inhibe edici etkisinin ortaya koyulmasıdır. İlk olarak, 100 µL 1x10⁶ kob/ml maya/bakteri suşu içeren ve 100 µL taze TSB

besiyeri içeren toplam 200 µL’lik süspansiyon 96-kuyucuklu polistren mikropalakalara yüklenmiş, 37°C’de bir gece boyunca inkübasyonda bekletilmiştir. İnkübasyon süresini takiben adezyon sağlayamayan mikroorganizmaların PBS ile yıkanması suretiyle ortamdan uzaklaştırılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından, içinde 0-160 µg/ml arasında değişen dozlarda hazırlanan Gossypin maddesi içeren 200 µL’lik TSB medyumuna kuyucuklara eklenmiş ve tekrar 37°C’de bir gece boyunca inkübasyona alınmıştır²⁴.

Biyofilm gelişimini takiben uygulanan gossypin’in etkisinin ölçülebilmesi amacıyla menadion ve MTT çözeltileri kullanılmıştır. MTT çözeltisi 100 ml PBS içinde çözdürüldükten sonra, 0.22 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril hale getirilmiş ve tüpler ışıktan korunacak şekilde alüminyum folyo ile kaplanarak -80°C’de saklanmıştır. Takip eden süreçte, menadion çözeltisi, 10 ml %100’lük aseton içinde 17,22 mg menadionun çözünmesiyle 10 mM olacak şekilde hazırlanmış, steril ependorflara 10 µl’lik kısımlar halinde dağıtılmış ve -80°C’de saklanmıştır. Deney zamanı geldiğinde 10 ml MTT ve 1 µl menadione 96 kuyucuklu plakalara dağıtılarak 37°C’de 90 dakika inkübe edilmiştir. OD, MultiSkan GO (Thermo Fisher Scientific) ELISA okuyucu ile 570 nm dalga boyunca ölçülmüştür.

Adezyon ve İnvazyon Deneyleri

Çalışmamızda hücrelerin enfekte edilmesi amacıyla bakteri kullanıldığından dolayı, hücre kültürünün devamlılığı için hücre pasajlarında kullanılmak üzere 200 ml (penisilin/streptomisin/gentamisin antibiyotik solüsyonu içeren) hücre kültür ortamı kullanılmış, bakteri enfeksiyonunu takiben yapılan hücre kültür çalışmalarında ise antibiyotik solüsyonu ve L-glutamin içermeyen hücre kültür ortamı kullanılmıştır.

Kontaminasyonun önüne geçebilmek için sterilite şartlarına azami özen gösterilmiştir.

Bu çalışmada, laboratuvarımızda pasajları mevcut olan Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan "ATCC, HTB-37" kodlu insan Epitelyal Kolorektal hücre hattı (Caco-2) kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarının tamamı steril laminar kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. 20 mL Fetal Bovine Serum (FBS), toplamda 8 ml antibiyotik solüsyonu, L-glutamin, vitamin karışımı, non-essential amino asit karışımı ve 172 mL Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) medyum karıştırılarak hücreler T75 flasklara ekilmiştir. 37°C, %5 CO2 şartlarda inkübe edilen hücreler yeterli konfluense ulaştığında, eski kültür ortamı uzaklaştırılmış ve flask 5 ml PBS ile yıkanmıştır. Ardından, flaska 800 µL tripsin eklenerek 4-5 dk inkübatörde bekletilmiş, pipetaj yardımıyla hücreler, flask yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra yaklaşık 10 mL'lik hacmin 3.5 mL'si hücre pasajı için yeni flaska aktarılıp taze kültür ortamı ile 15 mL'ye tamamlanarak hücre kültürünün devamlılığı için 37°C'de inkübe edilmiştir. Kalan hacim yeni bir falkon tüpe aktarılarak 900 rpm de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpenatant dökülerek, pelet muhafaza edilmiştir. Ardından, pelet, antibiyotik içermeyen kültür ortamından (Modified Eagle Medium-MEM+FBS %10) yaklaşık 5 mL eklenerek süspansiyon edilmiştir. Hücre sayımı hemositometre aracılığı ile gerçekleştirilmiş ve hemositometredeki her kare içine 4x10⁵ hücre/mL yoğunluk olacak şekilde oranlama yapılmıştır. İstenilen hücre yoğunluğuna sahip hücre süspansiyonu elde edildikten sonra süspansiyon her kuyucuğa 1 ml gelecek şekilde 24 kuyucuklu plate plaklarına aktarılmıştır²⁵.

Bakteriyel kültür için kullanılan AIEC sıvı Luria-Bertoni (LB) besiyerlerine ekilmiş ve seriler için hemoliz tüpleri kullanılmıştır. Hücrelerin AIEC ile enfekte edilmesi işlemi başlamadan 3 saat önce AIEC suşu 37°C'de karbondioksitli inkübatörde inkübe edilmiştir. Ayrıca, Caco-2

hücreleri de 6 saat önce 37°C'de karbondioksitli inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, hücreler PBS ile iki kez yıkanmıştır. Hücrelerin enfeksiyonu için antibiyotiksiz kültür ortamından 1 mL her bir kuyucuğa eklenmiştir (her bir kuyucukta 4x10⁵ hücre/mL). Ardından, ilgili kuyucuklara AIEC bakteri süspansiyonundan eklenmiştir.

Mikroplaka kuyucuklarında yeterli konfluense ulaşıldığı anlaşılan hücreler üzerine daha önce de belirtildiği üzere DMSO içinde çözdürülen gossypin, 0 ile 160 µg/ml arasında değişen dozlarda uygulanmıştır. DMSO kaynaklı oluşması muhtemel etkinin bertaraf edilebilmesi amacıyla çalışmalarımızda yalnızca DMSO'nun uygulandığı bir deney grubu da yer almış, bu grupta elde edilen etki diğer gruplardaki veriden düşülerek daha sağlıklı sonuçlar elde edilmesi planlanmıştır.

MTT Canlılık Analiz Testi

96 kuyucuklu mikropalakada bulunan 100 µl medyum ve hücre karışımı üzerine, 10 µl hazırlanmış MTT solüsyonundan ilave edilmiş 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben, mikropalakadaki medyum bir pipet ile alınarak MTT çözücü solüsyonundan 100 µl ilave edilip 20 dk inkübatörde bekletilmiştir. Ardından, 96 kuyucuklu mikropalaka spektrofotometre ile 570 nm absorbans değerinde ölçümleri 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre canlılık eğrisi belirlenerek %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değeri logaritmik eğim grafiği ile hesaplanmıştır.

Caco-2 Hücreleri Üzerine Gossypin'in Antiadezif Etkisinin Tespiti

Adezyon deneyi Darfeuille-Michaud ve ark.²⁶ oluşturduğu protokole göre yapılmıştır. Kültür ortamından adezyon tabakasının kaldırılmasını takiben, medyum dökülerek her kuyucuk 1 mL PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkamanın ardından, mikropalaka kurutularak her kuyucuğa %1 konsantrasyona sahip triton X-100 500 µL

olacak şekilde ilave edilmiştir. Güçlü bir pipetaj yapıldıktan sonra her bir kuyucuktaki içeriğin tamamı ependorf tüplere transfer edilmiştir. Seri dilüsyonlar 10-1,10-2,10-3,10-4,10-5 oranlarında (450 µL de 50 µL olacak şekilde) yapıldıktan sonra AIEC bakteri suşu için LB-agar besiyerine 25 µL olacak şekilde çizgi ekim tekniği ile ekilmiş ve koloni sayımı için 37°C'de bir gece boyunca inkübasyona alınmıştır.

Caco-2 Hücreleri Üzerine Gossypin'in Antiinvazif Etkisinin Tespiti

İnvazyon deneyi Darfeuille–Michaud ve ark²⁶ oluşturduğu protokole göre yapılmıştır. İnkübasyon süresi dolmadan önce %1 oranında gentamisin (10 mg/mL) içeren kültür ortamı, örnek sayısına göre final hacim belirlenip taze olarak hazırlanmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda invazyon plakası alınmış, kültür ortamı dökülerek her bir kuyucuğa yaklaşık 1 mL PBS gelecek şekilde 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından, mikropilaka kurutularak her kuyucuğa 1 mL gentamisinli kültür ortamı ilave edilmiştir. Hücreler 1 saat boyunca 37 °C'de %5 CO2 ortamda inkübe edilmiştir. Ardından, her kuyucuk tekrar 1 mL PBS ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından, mikropilaka kurutularak her kuyucuğa %1 konsantrasyona sahip triton X-100 500 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. Güçlü bir pipetaj yapıldıktan sonra her bir kuyucuktaki içeriğin tamamı ependorf tüplere transfer edilmiştir. Seri dilüsyonlar 10-1,10-2,10-3, oranlarında (450 µL de 50 µL olacak şekilde) yapıldıktan sonra AIEC bakteri suşu için LB-agar besiyerine 25 µL olacak şekilde çizgi ekim tekniği ile ekilmiş ve koloni sayımı için 37°C'de bir gece boyunca inkübasyona alınmıştır.

BULGULAR

Gossypin'in Antibakteriyel ve Antifungal Etkileri

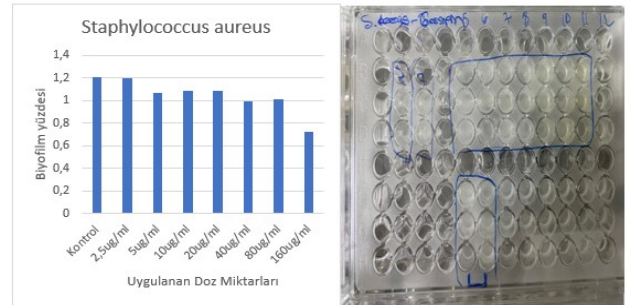
Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile gerçekleştirdiğimiz çalışmamız sonucunda; MİK

değerleri *Candida albicans* için 40 µg/ml, *Escherichia coli* için 40 µg/ml, *Staphylococcus aureus* için 80 µg/ml, *Enterococcus faecalis* için 80 µg/ml ve *Pseudomonas aeruginosa* için 80 µg/ml olarak saptanmıştır.

Gossypin'in Antibiyofilm Etkisi

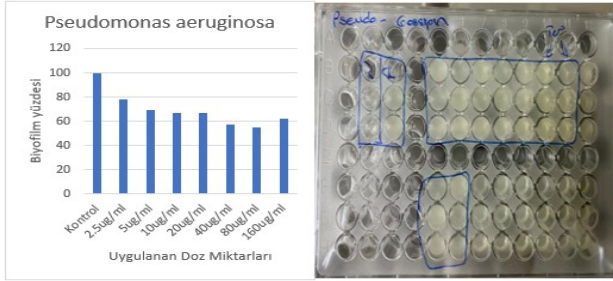
Antibiyofilm etkinliğinin varlığını saptadığımız gossypin isimli ajan farklı mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmler üzerinde farklı etkiler ortaya koymaktadır. Gerçekleştirilen in vitro deneyler sonucunda; biyofilmlerin oluşturulması, biyofilm varlığının tespit edilmesi, gossypin uygulaması ve ardından MTT ölçümleri sonucunda elde edilen grafikler aşağıda her mikroorganizma için ayrı ayrı verilmiştir.

İlk olarak, gossypin'in *Staphylococcus aureus* bakterisi üzerine olan etkinliği değerlendirilmiştir. 96 kuyucuklu plakalarda üretilen bakterinin oluşturduğu biyofilm üzerine 0, 20, 40, 80 ve 160 µg/ml doz aralığında uygulanan gossypin'in biyofilm oluşumunun önlenmesinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil-1).



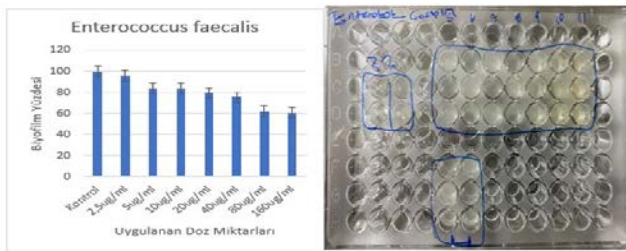
Şekil 1. Gossypin'in *Staphylococcus aureus* tarafından oluşturulan biyofilm formasyonu üzerine olan etkinliği

İkinci olarak, gossypin'in *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi biyofilm oluşumu üzerine olan inhibe edici etkisinin araştırılması sonucunda elde edilen grafik aşağıdaki gibidir. Kontrol grubuna kıyasla tüm dozlarda farklı oranlarda inhibe edici etki gözlemlenmiştir (Şekil-2).



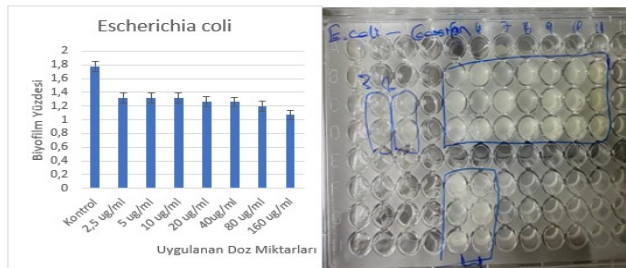
Şekil 2. Gossypin'in *Pseudomonas aeruginosa* tarafından oluşturulan biyofilm formasyonu üzerine olan etkinliği

Üçüncü mikroorganizma olan *Enterococcus faecalis*'in oluşturduğu biyofilm üzerine gossypin'in etkileri araştırıldığında, diğer bakterilere benzer olarak doza bağlı olacak şekilde gossypin'in etkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil-3).



Şekil 3. Gossypin'in *Enterococcus faecalis* tarafından oluşturulan biyofilm formasyonu üzerine olan etkinliği

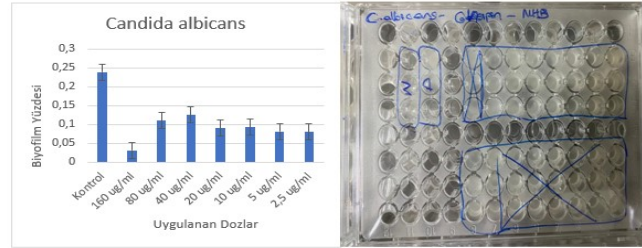
Dördüncü bakteri olarak çalışmamızda yer alan *Escherichia coli* üzerine gossypin'in etkileri araştırıldığında, yine doza bağlı olarak artan bir inhibe edici etki olduğu tespit edilmiştir (Şekil-4).



Şekil 4. Gossypin'in *Escherichia coli* tarafından oluşturulan biyofilm formasyonu üzerine olan etkinliği

Çalışmamızda kullandığımız son mikroorganizma olan *Candida albicans* için de diğer dört mikroorganizmada ortaya çıkan

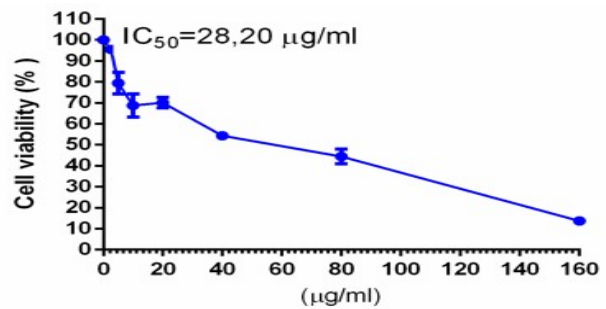
etkiye benzer etki tespit edilmiştir. Yüksek doz gossypin uygulamasının diğer dozlardan daha etkin bir şekilde *Candida albicans* biyofilm oluşumunu engellediği tespit edilmiş ve grafiğe yansıtılmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. Gossypin'in *Candida albicans* tarafından oluşturulan biyofilm formasyonu üzerine olan etkinliği

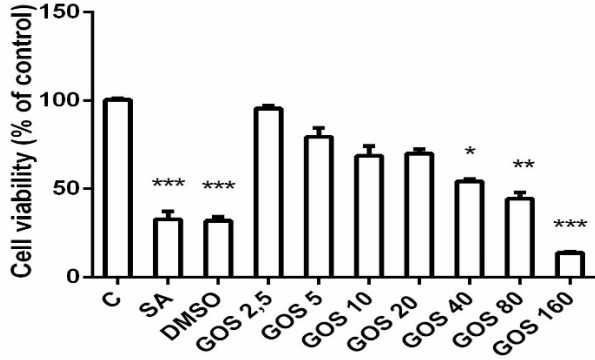
Caco-2 Hücrelerinde Gossypin'in Etkileri

Caco-2 kolon hücrelerinin olduğu ortama inoküle edilen *Escherichia coli* LF82 suşlarının sayısında gossypin doz uygulamasına bağlı olarak azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Düşük dozlarda etki oldukça az tespit edilirken, doza bağlı olarak etkinin arttığı tespit edilmiştir. 0-160 µg/ml doz aralığında uygulanan gossypin maddesinin ardından Caco-2 hücrelerinde ortaya çıkardığı IC₅₀ dozu Şekil 6'da gösterilmiştir. Bu çalışmada gossypin için elde edilen IC₅₀ dozu 28,20 µg/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 6. Gossypin'in IC₅₀ dozu grafiği

Yine Caco-2 hücrelerine bakteri verildikten 3 saat sonra uygulanan Gossypin dozlarına bağlı olarak 24 saatlik hücre canlılık analiz Şekil 7'de ki gibidir. Grafik detaylı olarak incelendiğinde yüksek doz Gossypin uygulamasının çok etkili olmadığı, 20-40 µg/ml aralığında bir dozun daha ideal olabileceği kanısına varılmıştır.



Şekil 7. MTT canlılık analiz sonuçları

Gossypin'in Antiadeziv Etkisi

Adezyon sonuçları incelendiğinde; AIEC bakterisinin özellikle 80 µg/ml gossypin uygulamasının gerçekleştirildiği grupta hücrelere % 61 daha az yapıştığı tespit edilmiştir (Tablo II). Düşük doz gossypin uygulamalarının adezyona etkisinin oldukça yüksek olduğunu söylemek mümkün değildir.

Gossypin'in Antiinvazif Etkisi

Kontrol grubunda tüm mikroorganizmaların hücrelerin içine invaze olduğunu varsayarak %100 olarak değerlendirilmiş ve gossypin dozları uygulaması sonucu elde edilen yüzdeler aşağıdaki tabloda paylaşılarak invazyon üzerine gossypin'in etkisi ortaya konulmaya çalışılmıştır. İnvazyon sonuçları incelendiğinde; AIEC bakterisinin özellikle 40 µg/ml gossypin uygulamasının gerçekleştirildiği grupta hücrelere % 33 daha az invaze olduğu tespit edilmiştir. Düşük doz gossypin uygulamalarının invazif etkisi var olmakla beraber yüzdesel olarak az miktardadır. İntraselüler AEIC tespiti en düşük saptanan gruplar 40, 80 ve 160 µg/ml gossypin uygulamasının gerçekleştirildiği gruplardır (Tablo 3).

Tablo III: Gossypin dozlarına ait invazyon sonuçları

Deney Grupları	Kontrolle göre % invazyon
Kontrol grubu	100
2.5 µg/ml gossypin uygulaması	83
5 µg/ml gossypin uygulaması	72
10 µg/ml gossypin uygulaması	71
20 µg/ml gossypin uygulaması	51
40 µg/ml gossypin uygulaması	33
80 µg/ml gossypin uygulaması	40
160 µg/ml gossypin uygulaması	38

TARTIŞMA

Mevcut literatür incelendiğinde, Hibiscus vitifolius'dan izole edilen gossypin'in, (3,5,8,3,4pentahidroksi-7-O-glukosil flavon 8-glukozit) antioksidant, antiinflamatuvar ve analjezik özelliklere sahip olduğu görülecektir²⁷⁻²⁹.

Çalışmamızda kullandığımız; Candida albicans, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis ve Pseudomonas aeruginosa isimli mikroorganizmalar üzerine çeşitli dozlarda uygulanan gossypin'in antibakteriyel, antifungal ve antibiyofilm etkinliğinin araştırılması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde doza bağlı olarak gossypin'in tüm bu mikroorganizmalarda biyofilm oluşumunu farklı yüzdelerde inhibe ettiği ve invitro deneylerde bakteri invazyonunu önleyerek mikroorganizma sayısını azalttığı tespit edilmiştir.

Gossypin'in çok sayıda bakteriye veya mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal etkilerinin incelendiği literatürde tek bir çalışma olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma 2007 yılında gerçekleştirilmiş olup 5 adet bakteri ve 1 adet maya hücresi üzerinde gossypin'in etkinliğinin denendiği bir çalışmadır³⁰. Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli,

Klebsiella pneumoniae ve Salmonella typhi isimli bakteriler ve Candida albicans isimli maya hücreleri üzerine gossypin etkinliğinin araştırıldığı bu çalışmadan elde edilen sonuçlar yüksek oranda çalışmamızdaki veriler ile benzerlik göstermekteydi (30). Yapılan değerlendirme sonucunda gossypin'in Escherichia coli ve Staphylococcus aureus üzerine orta derecede etkinliği; Pseudomonas aeruginosa ve Salmonella typhi üzerine hafif derecede etkinliği ve son olarak da Klebsiella pneumoniae üzerine ise etkisiz olduğu kanısına varılmıştır. Bizim çalışmamızda ortak olarak irdelenen 3 mikroorganizmaya karşı (Escherichia coli, Staphylococcus aureus ve Pseudomonas aeruginosa) gossypin'in orta ve yüksek derecede etkinliği gösterilmiştir ve çalışmamızda elde edilen MİK değerleri bu bakteriler için sırasıyla çalışmaları 40, 80 ve 80 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda gossypin'in Candida albicans biyofilm oluşumu üzerine etkinliği saptanarak grafik olarak sunulmuşken, Chamundeeswari ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gossypin'in C. albicans üzerine etkili olmadığı belirtilmiştir.

Bu çalışmanın dışında gossypin'in literatürde antibakteriyel veya antifungal etkisine dair herhangi bir veri mevcut değildir. Saf olarak gossypin'e ait antimikrobiyal veriler sınırlı olsa da, içinde majör komponent olarak bulunduğu Hibiscus vitifolius (ebegümece otu) isimli bitkinin ve aynı bitkideki diğer majör komponent olan apigenin'in antimikrobiyal etkinliklerinin olduğu yine mevcut literatürde karşımıza çıkmaktadır^{31,32}.

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları mevcuttur. Daha fazla mikroorganizma ve daha geniş konsantrasyon aralığında gossypin uygulamaları gerçekleştirilebilirdi. Ayrıca, çalışma sonuçlarının daha efektif değerlendirilebilmesi için ilave moleküler teknikler kullanılabilirdi. Gelecekte gerçekleştirilmesi muhtemel çalışmalarda bu kısıtlılıklar göz önünde bulundurulacaktır.

SONUÇ

Elde edilen sonuçlar, literatürde konu ile alakalı çok az veri olduğundan dolayı oldukça önemli bir yere sahiptir. Gossypin isimli doğal ajanın, çalışmamızda tanımlanmış antibakteriyel, antifungal ve antibiyofilm etkinliğinden yola çıkarak oldukça önemli bilimsel noktalara ulaşılabilir. Elde edilen bu veriler, ilerleyen zamanda gerçekleştirilecek detaylı çalışmalarda bir ön çalışma niteliği taşıyacaktır. Gossypin'in antimikrobiyal ve antibiyofilm etkisinin nasıl ortaya çıktığı, bu etkilerin ortaya çıkışında gossypin'in hangi mekanizmalara karşı etkili olduğu, bu mekanizmaların tetiklenmesi ve/veya inhibisyonunda üstlendiği görev gibi bazı bilimsel ve çözülmesi gereken sorular karşımızda durmaktadır. Planlanacak in vivo ve in vitro deneyler ile gossypin'in bu sorulara yanıt olabilecek verilerini elde etmek mümkündür. Bu etkilerin moleküler mekanizmasının çözümlenmesini takiben, yapılması muhtemel ilaç çalışmalarında bu veri ve mekanizmaların işlenmesi gerekmektedir. Diğer taraftan, hastalıkların tedavisinde doğal ürünlerin tercih edilmesinin bir takım sağlık sorunlarına yol açabileceği, ürünlerin etkili olup olmadığının saptanması yanında toksisite testleri ile olası zararlarının da belirlenmesi gerektiği bu ürünlerin etkinliğinin net bir şekilde ortaya konması için oldukça elzem bir durumdur. Tüm bu olaylar silsilesi ele alındığında, gossypin'in etkinliğinin tespitinin yanı sıra başarılı toksisite testlerinin gerçekleştirilmesinin ardından potansiyel ilaç olma ve/veya ilaç çalışmalarında işlenen mekanizmalara yönelik çalışmalara temel olma görevi yüksek potansiyeldir. Gelecek çalışmaların bu yönde gerçekleştirilmesini takiben elde edilecek somut ürünlerin; ülkemize toplumsal, sağlık, kültürel ve ekonomik alanlarda ciddi katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Sunum: Çalışmamız, 23-26 Nisan 2022 tarihinde Portekiz'in Lizbon kentinde düzenlenen 32.

European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) kongresinde poster olarak sunulmuştur.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma; herhangi bir canlı (insan, deney hayvanı) materyali içermediğinden, in vitro şartlarda standart olarak temin edilmiş referans mikroorganizma ve hücre hatları üzerinde gerçekleştirildiğinden dolayı etik kurul onayı gerektirmemektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Çalışmamız, TÜBİTAK tarafından 120S011 proje numarası ile desteklenmiştir.

Declaration of Conflicting Interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Disclosure: Our work was supported by TÜBİTAK with project number 120S011.

KAYNAKLAR

1. Manach C, Scalbert A, Morand C, et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(5):727-47.
2. Yang CS, Landau JM, Huang MT, et al. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:381-406.
3. Vuillemin A, Nguyen T, Pivot X, et al. Molecularly targeted agents: their promise as cancer chemopreventive interventions. *Eur J Cancer.* 2005 41(13):2003-15.
4. Kokoska L, Kloucek P, Leuner O, Novy P. Plant-Derived Products as Antibacterial and Antifungal Agents in Human Health Care. *Curr Med Chem.* 2019;26(29):5501-41.
5. Patel D, Shukla S, Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol.* 2007;30(1):233-45.
6. Kunnumakkara AB, Nair AS, Ahn KS, et al. Gossypin, a pentahydroxy glucosyl flavone, inhibits the transforming growth factor beta-activated kinase-1-mediated NF-kappaB activation pathway, leading to potentiation of apoptosis, suppression of invasion, and abrogation of osteoclastogenesis. *Blood.* 2007;109(12):5112-1.
7. Wang L, Wang X, Chen H, et al. Gossypin inhibits gastric cancer growth by direct targeting of AURKA and RSK2. *Phytother Res.* 2019;33(3):640-50.
8. Cinar I, Sirin B, Aydin P, et al. Ameliorative effect of gossypin against acute lung injury in experimental sepsis model of rats. *Life Science,* 2019;221:327-34.
9. Gautam P, Flora SJ. Oral supplementation of gossypin during lead exposure protects alteration in heme synthesis pathway and brain oxidative stress in rats. *Nutrition.* 2010;26(5):563-70.
10. Ganapaty S, Chandrashekhar VM, Narsu ML. Evaluation of anti-allergic activity of gossypin and suramin in mast cell-mediated allergy model. *Indian J Biochem Biophys.* 2010;47(2):90-5.
11. Babu BH, Jayram HN, Nair M., et al. Free radical scavenging, antitumor and anticarcinogenic activity of gossypin. *J Exp Clin Cancer Res.* 2003;22(4):581-9.
12. Viswanathan S, Thirugnanasambantham P, Ramaswamy S. A study on the role of cholinergic and gamma amino butyric acid systems in the antinociceptive effect of gossypin. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1993;20(3):193-6.
13. Chandrashekhar VM., Ganapaty S, Ramkishan A, et al. Neuroprotective activity of gossypin from *Hibiscus vitifolius* against global cerebral ischemia model in rats. *Indian J Pharmacol.* 2013;45(6):575-80.
14. Mody D, Athamneh AIM, Seleem MN. Curcumin: A natural derivative with antibacterial activity against *Clostridium difficile*. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019;19:30259-60.
15. Mosolygó T, Mouwakeh A, Hussein Ali M, et al. Bioactive Compounds of *Nigella Sativa* Essential Oil as Antibacterial Agents against *Chlamydia Trachomatis* D. *Microorganisms.* 2019;19:7-9.
16. Betts JW, Hornsey M, Higgins PG, et al. Restoring the activity of the antibiotic aztreonam using the polyphenol epigallocatechin gallate (EGCG) against multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol.* 2019;68(10):1552-9.
17. Yadav MK, Mailar K, Nagarajappa Masagalli J, et al. Ruthenium Chloride-Induced Oxidative

- Cyclization of Trans-Resveratrol to (\pm)- ϵ -Viniferin and Antimicrobial and Antibiofilm Activity Against *Streptococcus pneumoniae*. *Front Pharmacol*. 2019; 10:890.
18. İlhan S. Kurkuminin Kök Hücre Koruyucu ve Farklılaştırıcı Etkisinde Hipoksi ile İndüklenen Faktör-1 Alfa'nın Rolü. *Dicle Tıp Dergisi*. 2020;47(4):881-8.
19. Kılıç A, Uyanıkoğlu H, İncebiyık A. Rat Overinde İskemi-Reperfüzyon Üzerine N-Asetil Sistein ve Resveratrol'ün Koruyucu Etkisi. *Dicle Tıp Dergisi*. 2016;43(2):229-36.
20. Kuzay D. Effects of Thymoquinone on Oxidative Stress in the Testicular Tissue of Reserpinized Rats. *Dicle Tıp Dergisi*. 2019;46(4):831-7.
21. Celik E. Apoptotic and Anti-inflammatory Effects of *Hypericum Perforatum* Extract in Human Basal Cell Carcinoma TE 354.T Cell Line. *Dicle Tıp Dergisi*. 2021;48(1):92-8.
22. Mada SR, Metukuri MR, Burugula L, et al. Antiinflammatory and antinociceptive activities of gossypin and procumbentin-cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition studies. *Phytotherapy research*. 2008; 23(6):878-84.
23. Tan Y, Leonhard M, Moser D, et al. Antibiofilm efficacy of curcumin in combination with 2-aminobenzimidazole against single- and mixed-species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019; 174: 28-34.
24. Karamese M, Dicle Y. The Antibacterial and Antibiofilm Activities of Resveratrol on Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *Kafkas Journal of Medical Sciences*. 2022; 12(3): 201-6.
25. Aygun H, Karamese M, Ozic C, et al. The effects of mucosal media on some pathogenic traits of Crohn's disease-associated *Escherichia coli* LF82. *Future Microbiology*. 2018;13:141-9.
26. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004; 127(2):412-21.
27. Katary M, Salahuddin A. Ameliorative effect of gossypin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Science*. 2017;176:75-81.
28. Chandrashekhar VM, Ganapaty S, Ramkishan A, Narsu ML. Neuroprotective activity of gossypin from *Hibiscus vitifolius* against global cerebral ischemia model in rats. *Indian J Pharmacol*. 2013; 45(6): 575-80.
29. Fernandez SP, Nguyen M, Yow TT, et al. The Flavonoid Glycosides, Myricitrin, Gossypin and Naringin Exert Anxiolytic Action in Mice. *Neurochem Res*. 2009; 34: 1867-1875.
30. Chamundeeswari D, Sukumar E, Amar K, et al. Cytotoxic and antibacterial activities of gossypin. *Natural Product Sciences*. 2007; 13: 300-3.
31. Adamczak A, Ożarowski M, Karpiński TM. Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants. *Journal of Clinical Medicine*. 2019; 31; 9(1): 109.
32. Patel K, Kumar V, Verna A, et al. Gossypin: A phytochemical of multispectrum potential. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2016; <https://doi.org/10.12980/jclm.5.2017j6-227>.