ORİJİNAL ARAŞTIRMA ORIGINAL RESEARCH

DOI: 10.5336/medsci.2020-74815

Berberin-Klorürün Meme Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi ve Antimikrobiyal Aktivite Analizi

Evaluation of Cytotoxic Effects of Berberine-Chloride in Breast Cancer Cells and Antimicrobial Activity Analysis

Ergül Mutlu ALTUNDAĞ[a], Eda BECER[b,c], Gizem ŞANLITÜRK[c,d], Mümtaz GÜRAN[c], H. Seda VATANSEVER[c,f]

[a]Doğu Akdeniz Üniversitesi Dr. Fazıl Küçük Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, Gazimağusa, KKTC
[b]Yakın Doğu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya ABD, Lefkoşa, KKTC
[c]Yakın Doğu Üniversitesi DESAM Enstitüsü, Lefkoşa, KKTC
[d]Doğu Akdeniz Üniversitesi Dr. Fazıl Küçük Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, Gazimağusa, KKTC
[e]Doğu Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya ABD, Gazimağusa, KKTC
[f]Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, Manisa, TÜRKİYE

ÖZET Amaç: Bu çalışmada, berberin-klorürün antikanser etkinliğinin, 2 farklı kanser hücre hattında (MCF-7 meme kanseri hücreleri ve M4A4 metastatik meme kanseri hücreleri) analiz edilmesi ve antibakteriyel etkinliğinin 5 farklı standart bakteri suşunda araştırılması amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmada, MCF-7 meme kanseri hücreleri ve M4A4 metastatik meme kanseri hücreleri olmak üzere 2 hücre hattına karşı MTT analizi uygulanarak, berberin-klorürün zamana bağlı oluşturduğu inhibisyon araştırılmıştır. Ayrıca berberin-klorürün 6 standart suş [Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, "methicillin resistant S. aureus (MRSA)", Pseudomonas aeruginosa ve Enterococcus faecalis) kullanılarak antibakteriyel etkisi broth mikrodilüsyon ve agar zon difüzyon yöntemleri ile analiz edilmiştir. **Bulgular:** MCF-7 hücreleri için hücre canlılığının %50 inhibe olduğu konsantrasyon, 72 saatlik berberin-klorür muamelesi sonrası 19,57 µM, M4A4 hücreleri için ise 77,7 µM olarak bulunmuştur. Broth mikrodilüsyon testinde minimum inhibitör konsantrasyonu değerleri, S. aureus, MRSA, E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa ve E. faecalis için sırasıyla 0,49 µg/mL, 0,98 µg/mL, 0,0038 µg/mL, 3,91 µg/mL, 0,03 µg/mL ve 0,49 µg/mL olarak bulunmuştur. Agar kuyucuk difüzyon testinde zon inhibisyon değerleri S. aureus, MRSA, E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa ve E. faecalis için sırasıyla 30 mm, 30 mm, 35 mm, 17 mm, 33 mm ve 20 mm olarak bulunmuştur. **Sonuç:** Çalışmada, berberin-klorürün farklı hücre hatlarına antikanser etkisi ve yaygın olarak enfeksiyona sebep olan bakterilere karşı antibakteriyel etkinliği olduğu in vitro olarak gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Berberin-klorür; antibakteriyel; antikanser; sitotoksisite; MTT analizi

ABSTRACT Objective: In this study, it was aimed to analyse the anti-cancer activity of berberine-chloride in two different cancer cell lines (MCF-7 breast cancer cells and M4A4 metastatic breast cancer cells) and to investigate the antibacterial activity in five different standard bacterial strains. **Material and Methods:** In the study, the time-dependent inhibition by berberine chloride was investigated by applying MTT assay against two cell lines, which are MCF-7 breast cancer cells and M4A4 metastatic breast cancer cells. In addition, the anti-bacterial effect of berberine chloride was analysed by using six standard strains [Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, methicillin resistant S. aureus (MRSA), Pseudomonas aeruginosa and Enterococcus faecalis] with the broth microdilution and agar zone diffusion methods. **Results:** The concentration at which cell viability was 50% inhibited for MCF-7 cells after 72 hours of berberine chloride treatment was found to be 19.57 µM and 77.7 µM for M4A4 cells. Minimum inhibitory concentration values in broth microdilution test for S. aureus, MRSA, E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa and E. faecalis, was found to be 0.49 µg/mL, 0.98 µg/mL, 0.0038 µg/mL 3.91 µg/mL, 0.03 µg/mL and 0.49 µg/mL respectively. Zone inhibition values in agar well diffusion test was found as 30 mm, 30 mm, 35 mm, 17 mm, 33 mm and 20 mm for S. aureus, MRSA, E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa and E. faecalis, respectively. **Conclusion:** In the study, berberine-chloride anti-cancer effect on different cell lines and antibacterial activity against commonly infectious bacteria has been shown in-vitro.

Keywords: Berberine chloride; anti-bacterial; anti-cancer; cytotoxicity; MTT assay

Correspondence: Ergül Mutlu ALTUNDAĞ
Doğu Akdeniz Üniversitesi Dr. Fazıl Küçük Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, Gazimağusa, KKTC
E-mail: ergul.altundag@emu.edu.tr

Peer review under responsibility of Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.

Received: 21 Mar 2020 ***Received in revised form:*** 9 May 2020 ***Accepted:*** 18 May 2020 ***Available online:*** 22 Sep 2020

2146-9040 / Copyright © 2020 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Meme kanseri, kadınlar arasında en yaygın görülen bir malign tümör olarak bilinmektedir. Dünya çapında kadınlar için morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biridir. Birçok hasta hâlâ yüksek oranda tekrarlayan metastatik meme kanseri riskiyle karşı karşıyadır.[1] Meme kanseri ve metastazın önlenmesi açısından yeni doğal ürünlerin uygulanması tedaviye alternatif olabilir. Doğal ürünler, sahip oldukları biyolojik aktivitelerinden ve düşük toksisitelerinden dolayı yeni antikanser ajanı olma yönünde birer adaydır. Berberin-klorür, çeşitli Çin bitkilerinin aktif bileşeni olan ve Çin tıbbında yaygın olarak kullanılan Çin bitkisi *Rhizoma coptidis*'ten izole edilmiş hidroklorür tuzudur.[2]

Berberin-hidroklorür ve izokinolin alkaloid olarak berberinin biyolojik özellikleri araştırılmış ve ishal, hipertansiyon, diyabet ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde klinik olarak kullanılmıştır.[3] Daha önce yapılan çalışmalar, berberin-klorürün antiinflamatuar, lipid düşürücü, hipoglisemik, immünregülatör, hepatoprotektif ve antikanser etkilere sahip olduğunu göstermiştir.[4-7]

Ayrıca berberin, çok uzun süreden beri gastrointestinal hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır.[8] Çin'de uzun zamandır gastrointestinal bir ilaç olarak kullanılan berberinin antikanser etkileri, son zamanlarda özellikle gastrik kanser, kolorektal kanser, prostat kanseri, meme kanseri ve akciğer kanseri ile ilgili çalışmalarda gösterilmiştir.[9-13] Berberin-hidroklorürün kemoterapinin/radyoterapinin etkilerini artırdığı ve kanser tedavisinde olumlu sonuçlar gösterdiği belirtilmiştir.[14]

Tümör mikroçevresinde yağ dokusu ve adiposit metabolizmasının gelişimi ile mekanizmalar incelendikten sonra, berberinin etkinliğinin araştırılması öngörülmüştür. Bunun yanı sıra çeşitli bitki türlerinde yaygın olarak bulunması ve düşük toksisiteye sahip olması, berberinin gelecekte etkili bir antikanser ajanı olma yönünde bir potansiyele sahip olacağını göstermektedir.

Bu çalışmanın amacı, berberin-klorürün, MCF-7 meme kanseri ve M4A4 metastatik meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkilerini ve antibakteriyel aktivitesini belirlemektir. Bu verilerin, meme kanseri tedavisinde yeni stratejiler geliştirilmesine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu [American Type Culture Collection (ATCC)]'ndan alınan hücre kültür hatları kullanılarak yapıldığı için herhangi bir etik kurul onayı gerektirmemektedir.

KİMYASALLAR

Berberin-klorür (B3251), fetal sığır serumu [fetal bovine serum (FBS)] (Capricorn Scientific, FBS-11B), penisilin/streptomisin (Biochrom, A2213), L-glutamin (EMD Millipore, K0282), RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640, Biochrom), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), (Glentham Life Sciences, GC4568), dimetil sülfosit (DMSO) (Applichem, A3672) Mueller-Hinton broth (MHB) (S/N: 1.10293.0500) ve Mueller-Hinton agar (MHA, Merck; 1.05437.0500).

HÜCRE KÜLTÜRÜ

İnsan meme kanseri MCF-7 (HTB-22) ve M4A4 (CRL-2914) hücre hatları ATCC'den ticari olarak satın alınmıştır (ATCC, Manassas, VA, ABD). Her iki meme kanseri hücre hattı RPMI-1640 besiyerine %10'luk ısı ile inaktive edilmiş FBS, %1'lik 100 ünite/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin, %1'lik 2 mM L-glutamin eklenerek 37 °C'de, %5 CO_2'li ortamda çoğaltılmıştır.

SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ

Berberin-klorürün MCF-7 ve M4A4 meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini araştırmak için MTT analizi gerçekleştirildi. Öncelikle hücreler, $5x10^3$ hücre/mL olacak şekilde 96 plaklı kuyucuklara ekildi. Hücrelerin yapışması için 24 saat beklenildi. Yirmi dört saat sonra 0, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında berberin-klorür ile 24, 48 ve 72. saatlerde doz ve zaman bağımlı olarak muamele edildi. Belirtilen sürelerde muamele edildikten sonra besiyeri değiştirildi ve hücreler 5 mg/mL MTT solüsyonu ile 37 °C'de 4 saat %5 CO_2li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her kuyuya 50 µL DMSO eklendi. Ardından absorbans ölçümleri 540 nm'de mikroplak okuyucuda (Versa Max, Molecular Device, Sunnyvale, ABD) gerçekleştirildi. Absorbans ölçümlerinden aşağıdaki formüle göre her bir konsantrasyondaki % canlılık değerleri belirlendi ve zamana

bağlı olarak hücre canlılığının %50 inhibe olduğu konsantrasyon değeri CompuSyn (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ, ABD) yazılım programı kullanılarak hesaplandı.

Hücre Canlılığı (%) = (Örnek-Blank)/(Kontrol-Blank)x100 formülüne göre hesaplandı.

ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE TESTLERİ

Berberin-klorürün antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesinde broth mikrodilüsyon ve agar kuyu difüzyon (well diffusion) testleri kullanıldı. Stok olarak hazırlanan 5 mg/mL'lik berberin-klorür çözeltisi kullanıldı. Her iki testte de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213™), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC®11706™), "methicillin resistant *S. aureus* (MRSA)" (ATCC® 12493™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212™) kullanılan standart suşlardı.

Broth mikrodilüsyon testi için seri dilüsyonlar, 96 kuyucuklu mikro plaka içerisinde Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü rehberlerinde önerildiği şekilde yapıldı.[15] Kuyucuklara ilk olarak 50 µL MHB çözeltisi eklendi. Berberin-klorür dilüsyonları (%1'lik DMSO çözeltisi ile) ayarlandıktan sonra 18 saatlik taze 10^6 CFU/mL konsantrasyonundaki bakteriyel süspansiyonlar hazırlandı. Her kuyucuğa, 50 µL bakteri süspansiyonu (negatif kontrol dışında) eklendi. Hazırlanan test plakaları 24 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi ve sonuçlar 18 saat sonra okunarak her bakteri örneği için berberin-klorürün minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) belirlendi.

Agar kuyu difüzyon testi için MHA besiyeri kullanıldı. Bu testte, 7 mL MHA içerisine yaklaşık 10^7 CFU/mL konsantrasyonunda taze standart suşlarla hazırlanmış süspansiyonlar (0,3 mL) inokule edildi. MHA plakları kuruduktan sonra her plak üzerine 0,3 mm çapında kuyucuklar açıldı. Daha sonra bu kuyucuklara berberin-klorür stok çözeltisinden 50 mL kadar ilave edilerek, plaklar 24 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi ve mm cinsinden inhibisyon alanları 18 saat sonra belirlendi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

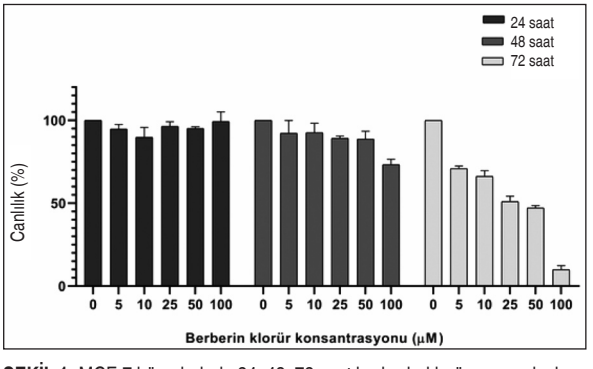
İstatistiksel analiz, GraphPad Prism, versiyon 8.0 kullanılarak gerçekleştirildi. Deneysel ve kontrol grupları arasındaki farklılığın önemi tek yönlü ANOVA ve Dunnett test kullanılarak analiz edildi. Her bir deney grubu n=3 tekrarlı olarak yapıldı. Anlamlılık düzeyi olarak α=0,05 alınmıştır.

BULGULAR

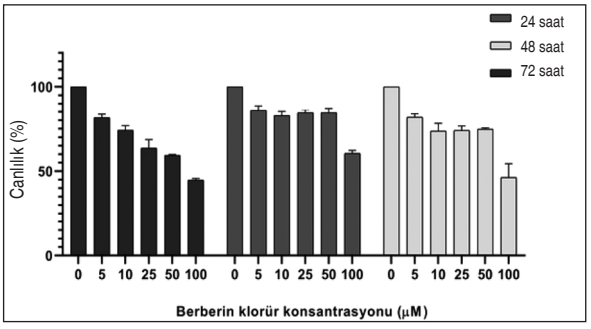
Bu çalışmada, MTT analizi ile berberin-klorürün doz ve zaman bağımlı olarak hem MCF-7 hem de M4A4 insan meme kanseri hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bulundu. MTT sonuçlarına göre; her iki meme kanseri hücrelerinde kontrol grubuna berberin-klorür uygulanmış ve her grup kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. MCF-7 hücrelerine 5, 10, 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saatlik berberin-klorür muamelesi sonrasında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, sırasıyla 24 saat için %94, %89, %96, %95, %99 inhibisyon; 48 saat için %92, %92, %89, %88, %73 inhibisyon; 72 saat için %70, %66, %51, % 47 ve %10 hücre proliferasyonu inhibisyonu görüldü (Şekil 1).

M4A4 hücrelerinde ise 5, 10, 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saatlik berberin-klorür muamelesi sonrasında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, sırasıyla 24 saat için %85, %82, %84, %84, %60 inhibisyon; 48 saat için %81, %74, %74, %74, %46 inhibisyon; 72 saat için %81, %74, %64, %60, %44 hücre proliferasyonu inhibisyonu gözlemlendi (Şekil 2).

Hücre canlılığının her iki hücre hattında doz ve zaman bağımlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir (Tablo 1).



ŞEKİL 1: MCF-7 hücrelerinde 24, 48, 72 saat berberin-klorür muamelesi sonucu hücre canlılığı grafiği.



ŞEKİL 2: M4A4 hücrelerinde 24, 48, 72 saat berberin-klorür muamelesi sonucu hücre canlılığı grafiği.

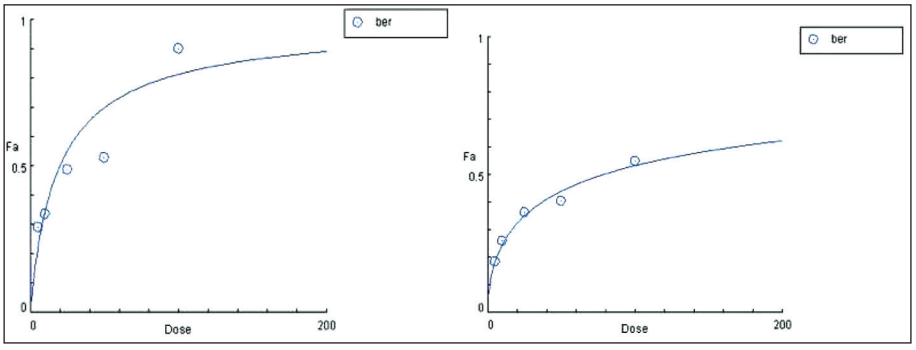
Fraksiyonel etki (Fa) değeri, herhangi bir ajan muamelesi sonrasında hücrelerin ölümünü gösteren bir değerdir. Eğer Fa değeri "0" ise hiç hücre ölümünün olmadığı anlamına gelir. Eğer bu değer "1" ise hücrelerin %100'ünün öldüğü anlamına gelmektedir. Hücre canlılığının %50'sinin inhibe olduğu değer, Fa=[(1-(canlılık)/100)] formülünden hesaplanan Fa değerlerinin CompuSyn yazılım programına girilmesi ile bulundu. Bu formülden çizilen doz- etki grafiğine göre hem MCF-7 hem de M4A4 hücreleri için %50 inhibe olan konsantrasyonlar belirlendi (Şekil 3).

MCF-7 hücreleri için hücre canlılığının %50 inhibe olduğu konsantrasyon 72 saatlik berberin-klorür muamelesi sonrası 19,57 µM, M4A4 hücreleri için ise 77,7 µM olarak bulundu. Berberin-klorürün antibakteriyel etkinliğinin araştırıldığı antibakteriyel aktivite deneyleri sonucunda berberin-klorürün yüksek antibakteriyel etkinlikte olduğu belirlendi. Broth mikrodilüsyon testi sonuçlarına göre berberin-klorürün MİK değerleri *S. aureus* ve MRSA için 62,5 mg/mL, *E. coli* ve *K. pneumoniae* için 500 mg/mL, *P. aeruginosa* ve *E. faecalis* için ise 1.000 mg/mL olarak bulundu. Broth mikrodilüsyon testinde pozitif kontrol olarak kullandığımız siprofloksasin antibiyotiğinin MİK değerleri ise *S. aureus* için 0,49 mg/mL, MRSA için 0,98 mg/mL, *E. coli* için 0,0038 mg/mL, *K. pneumoniae* için 3,91 mg/mL, *P. aeruginosa* için 0,03 mg/mL ve *E. faecalis* için ise 0,49 mg/mL olarak bulundu. Ayrıca etkinliği test edilen saf DMSO çözeltisinin, %12,5'ten düşük konsantrasyonlarda antibakteriyel etkinliğinin olmadığı gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre berberin-klorürün gram (+) bakterilere daha yüksek etkinlikte ve tıbbi kullanımda olan siprofloksasin antibiyotiğine göre daha düşük aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Agar kuyu difüzyon yönteminde ise broth mikrodilüsyon sonuçları ile uyumlu inhibisyon zonları görülmüştür. Agar kuyu difüzyon testi sonucunda elde edilen inhibisyon zonu değerleri ve ilgili görseller Resim 1'de görülmektedir. Kontrol olarak kullanılan siprofloksasin antibiyotiğinde inhibisyon zonları *S. aureus* için 30 mm, MRSA için 30 mm, *E. coli* için 35 mm, *K. pneumoniae* için 17 mm, *P. aeruginosa* için 33 mm ve *E. faecalis* için ise 20 mm olarak bulundu.

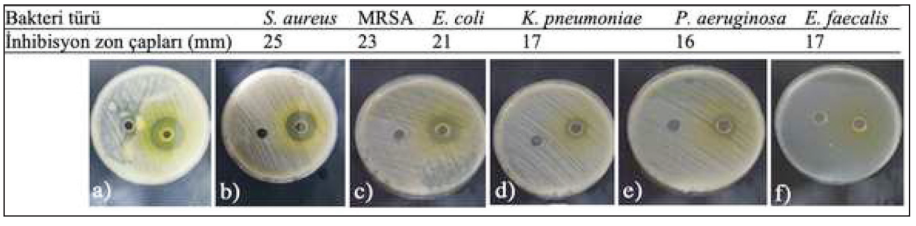
TABLO 1: MCF-7 ve M4A4 hücrelerinde doz ve zaman bağımlı olarak berberin-klorürün sitotoksik etkisi.

MCF-7 hücrelerine uygulanan konsantrasyonlar	24 saat (p)	48 saat (p)	72 saat (p)
Kontrole karşı 5 µM	ns	ns	****
Kontrole karşı 10 µM	*	ns	****
Kontrole karşı 25 µM	ns	*	****
Kontrole karşı 50 µM	ns	*	****
Kontrole karşı 100 µM	ns	****	****
M4A4 hücrelerine uygulanan konsantrasyonlar	24 saat (p)	48 saat (p)	72 saat (p)
Kontrole karşı 5µM	****	***	****
Kontrole karşı 10 µM	****	****	****
Kontrole karşı 25 µM	****	****	****
Kontrole karşı 50 µM	****	****	****
Kontrol vs 100 µM	****	****	****

Veriler, ortalama standart sapma (SS) olarak ifade edilmiştir (her deney n=3 tekrarlıdır). Kontrol ile karşılaştırıldığında ns=Anlamlı değil, *p<0,5; ***p<0,001; ****p<0,0001 göstermektedir.



ŞEKİL 3: MCF-7 ve M4A4 hücrelerine 72 saatlik berberin-klorür muamelesi sonrası doz- fraksiyonel etki (Fa) grafiği.



RESİM 1: Agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak elde edilen berberin-klorür inhibisyon zon değerleri ve test sonuçlarının görüldüğü görseller. a) S. aureus, b) MRSA, c) E. coli, d) K. pneumoniae, e) P. aeruginosa, f) E. faecalis (Soldaki kuyucuklar negatif kontrol olarak kullanılan DMSO, sağdaki kuyucuklar ise berberin-klorür içermektedir).

TARTIŞMA

Meme kanseri, kadın sağlığını ciddi şekilde etkileyen ve dünya genelinde yaygın olarak görülen malignant bir tümördür. Kanser tedavilerinde kemoterapinin yanı sıra doğal ajanların kullanımı ile alternatif tedavi seçeneklerine ait çalışmalar güncel konulardandır. Bu doğal ajanlar arasında bitkilerden izole edilen berberin flavonoidi yer almaktadır. Berberin, farmakolojik özelliği, düşük toksisitesi ve maliyeti nedeni ile dikkat çekmiştir. Aynı zamanda, yapılan çalışmalarda, berberinin antiinflamatuar, antioksidan, antinosiseptif ve antikolinerjik etkilerini içeren farmakolojik özellikleri tanımlanmıştır.[16-18] Birçok kanser türünde yapılan çalışmalara rağmen normal ve metastatik meme kanserinde berberinin antikanser mekanizmasıyla ilgili bilgiler sınırlıdır. Bir çalışmada, berberin-klorürün küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde inhibisyona ve apoptotik hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir.[13] Diğer çalışmalarda ise meme, kolon ve yumurtalık kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı bildirilmiştir.[19-21] Klinik öncesi çalışmalarda da berberinin hepatoma, lösemi, meme, akciğer, kolon ve servikal kanser türlerinde de inhibitör etkiye neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu kanser hücrelerinde anjiyogenezi ve vasküler endotel büyüme faktörünün mRNA ekspresyonunu inhibe ederek apoptozu uyarmıştır.[22]

Bitkilerin mikropları öldürerek veya mikroplara karşı direnerek mikrobiyal ataklara karşı kendilerini korumak için sekonder metabolit ürettiği bilinmektedir.[23] Çalışmamızda, berberin-klorürün hem metastatik (M4A4) hem de metastatik olmayan (MCF-7) meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığını inhibe ettiği gösterildi. Metastatik meme kanseri hücrelerinde daha önceden yapılan herhangi bir çalışma olmadığından bu sonuçların, berberin-klorürün moleküler mekanizmalarının aydınlatılması açısından literatüre önemli katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Flavonoidler, son yıllarda, antimikrobiyal özellikleri nedeni ile de bilimsel açıdan oldukça ilgi çekmiştir. Birçok bitkiden farklı flavonoidler izole edilerek tanımlanmış, antibakteriyel, antifungal ve antiviral özellikleri gösterilmiştir.[24] Ayrıca çeşitli antibiyotiklerle berberin dâhil birçok flavonoidin sinerjistik mekanizmalarla çalıştığı da gösterilmiştir.[25,26]

Daha önce berberinin antimikrobiyal etkinliği farklı klinik profilli izolatta bildirilmiştir. Berberin etki mekanizması *Streptococcus pyogenes* türünde çalışılmış ve karbohidrat metabolizması, DNA, protein ve yağ asitleri sentez yolakları gibi pek çok bakteriyel metabolik süreci inhibe ettiği son yapılan bir çalışmada gösterilmiştir.[27] Ancak, berberinin standart suşlarda etkinliğini irdeleyen çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu nedenle, bu çalışmada geniş bir standart suş havuzunda berberin-klorürün antimikrobiyal etkinliği farklı yöntemlerle analiz edilmiştir. Farklı yöntemlerle elde edilen ve birbirini doğrulayan sonuçlar, kullanılan kontroller (siprofloksasin ve DMSO) ile birlikte değerlendirildiğinde, berberin-klorürün antibiyotiklere göre daha düşük, ancak flavonoidlere göre etkin bir antimikrobiyal olduğunu göstermektedir.[28] Ayrıca sonuçlarımız, berberin-klorürün gram (+) bakterilere karşı daha düşük dozlarda etkin olduğunu göstermiştir. Berberin flavonoidinin antimikrobiyal etkinliği, klinik uygulamalar bağlamında özellikle kronik enfeksiyonlar ve antibiyotik seçenekleri sınırlanmış (bakteriyel direnç ya da hasta ile ilişkili kısıtlayıcı faktörler) olgularda önem kazanmaktadır. Bunun sebebi, doğal bir ürün olmasından dolayı yüksek dozlarda toksisite ihtimalinin ve direnç indüksiyon potansiyelinin antibiyotiklere kıyasla çok daha düşük olmasıdır. Nitekim, çalışmamıza da dâhil edilmiş suşlar olan *E. coli* ilişkili sepsis ya da *S. aureus* protez ilişkili eklem enfeksiyon olgularında berberinin etkinliği gösterilmiştir.[29,30] Berberin-klorürün MRSA suşunda bulduğumuz MİK (62,5 mg/mL) ve inhibisyon zon değerleri (23 mm) dirençli enfeksiyonlarda kullanım potansiyelini de göstermektedir. Bu veri, literatürde daha önce gösterilen çoklu ilaç dirençli *Candida albicans* ve *Salmonella* spp. enfeksiyonlarındaki etkinlik değerleri ile uyumludur.[31,32] Tüm bu bilgiler ışığında berberin-klorür, yüksek antimikrobiyal etkinliği ile özellikle kronik veya antibiyotik seçenekleri sınırlı enfeksiyonlarda önemli bir alternatif olarak görülmektedir.

SONUÇ

Çalışmamızda, berberin-klorürün metastatik ve metastatik olmayan meme kanserleri üzerindeki sitotoksik ve *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *E. faecalis* bakterileri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi gösterilmiştir. Bu sonuçların, berberin-klorürün kanser hücrelerindeki moleküler etki mekanizmalarının aydınlatılması, antimikrobiyal etkinliğinin in vivo olarak analiz edilmesi ve farmakolojik etkileşimlerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalara bir ön veri oluşturacağına inanmaktayız.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin, çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: *Ergül Mutlu Altundağ, Eda Becer, Gizem Şanlıtürk, Mümtaz Güran;* ***Tasarım:*** *H. Seda Vatansever, Ergül Mutlu Altundağ, Eda Becer, Gizem Şanlıtürk;* ***Denetleme/Danışmanlık:*** *Mümtaz Güran, H. Seda Vatansever, Ergül Mutlu Altundağ;* ***Veri Toplama ve/veya İşleme:*** *Eda Becer, Gizem Şanlıtürk, Mümtaz Güran;* ***Analiz ve/veya Yorum:*** *H. Seda Vatansever, Ergül Mutlu Altundağ, Eda Becer, Gizem Şanlıtürk;* ***Kaynak Taraması:*** *Mümtaz Güran, H. Seda Vatansever, Ergül Mutlu Altundağ;* ***Makalenin Yazımı:*** *Ergül Mutlu Altundağ;* ***Eleştirel İnceleme:*** *Ergül Mutlu Altundağ, Eda Becer, Gizem Şanlıtürk, Mümtaz Güran, H. Seda Vatansever;* ***Kaynaklar ve Fon Sağlama:*** *Ergül Mutlu Altundağ, Eda Becer, Gizem Şanlıtürk,* ***Malzemeler:*** *Mümtaz Güran, H. Seda Vatansever.*

KAYNAKLAR

1. Toriola AT, Colditz GA. Trends in breast cancer incidence and mortality in the United States: implications for prevention. Breast Cancer Res Treat. 2013;138(3):665-73. [Crossref] [PubMed]
2. Tan W, Li Y, Chen M, Wang Y. Berberine hydrochloride: anticancer activity and nanoparticulate delivery system. Int J Nanomedicine. 2011;6:1773-7. [Crossref] [PubMed] [PMC]
3. Affuso F, Mercurio V, Fazio V, Fazio S. Cardiovascular and metabolic effects of berberine. World J Cardiol. 2010;2(4):71-7. [Crossref] [PubMed] [PMC]
4. Wang X, Feng S, Ding N, He Y, Li C, Li M, et al. Anti-inflammatory effects of berberine hydrochloride in an LPS-induced murine model of mastitis. Evid Based Complement Alternat Med. 2018;2018:5164314. [Crossref] [PubMed] [PMC]
5. Pirillo A, Catapano AL. Berberine, a plant alkaloid with lipid- and glucose-lowering properties: from in vitro evidence to clinical studies. Atherosclerosis. 2015;243(2):449-61. [Crossref] [PubMed]
6. Zhang H, Wei J, Xue R, Wu JD, Zhao W, Wang ZZ, et al. Berberine lowers blood glucose in type 2 diabetes mellitus patients through increasing insulin receptor expression. Metabolism. 2010;59(2):285-92. [Crossref] [PubMed]
7. Li X, Zhao SJ, Shi HL, Qiu SP, Xie JQ, Wu H, et al. Berberine hydrochloride IL-8 dependently inhibits invasion and IL-8-independently promotes cell apoptosis in MDA-MB-231 cells. Oncol Rep. 2014;32(6):2777-88. [Crossref] [PubMed]
8. Chen C, Yu Z, Li Y, Fichna J, Storr M. Effects of berberine in the gastrointestinal tract-a review of actions and therapeutic implications. Am J Chin Med. 2014;42(5):1053-70. [Crossref] [PubMed]
9. Hu Q, Li L, Zou X, Xu L, Yi P. Berberine attenuated proliferation, invasion and migration by targeting the AMPK/HNF4α/WNT5A pathway in gastric carcinoma. Front Pharmacol. 2018;9:1150. [Crossref] [PubMed] [PMC]
10. Liu H, Huang C, Wu L, Wen B. Effect of evodiamine and berberine on miR-429 as an oncogene in human colorectal cancer. Onco Targets Ther. 2016;9:4121-7. [Crossref] [PubMed] [PMC]
11. Tian Y, Zhao L, Wang Y, Zhang H, Xu D, Zhao X, et al. Berberine inhibits androgen synthesis by interaction with aldo-keto reductase 1C3 in 22Rv1 prostate cancer cells. Asian J Androl. 2016;18(4):607-12. [Crossref] [PubMed] [PMC]
12. Sun Y, Wang W, Tong Y. Berberine inhibits proliferative ability of breast cancer cells by reducing metadherin. Med Sci Monit. 2019;25:9058-66. [Crossref] [PubMed] [PMC]
13. Li J, Liu F, Jiang S, Liu J, Chen X, Zhang S, et al. Berberine hydrochloride inhibits cell proliferation and promotes apoptosis of non-small cell lung cancer via the suppression of the MMP2 and Bcl-2/Bax signaling pathways. Oncol Lett. 2018;15(5):7409-14. [Crossref]
14. Patil JB, Kim J, Jayaprakasha GK. Berberine induces apoptosis in breast cancer cells (MCF-7) through mitochondrial-dependent pathway. Eur J Pharmacol. 2010;645(1-3):70-8. [Crossref] [PubMed]
15. Barry AL, Craig WA, Nadler H, Reller LB, Sanders CC, Swenson JM. M26-A Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999;19(18):1-29. [Link]
16. Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. Berberine and barberry (Berberis vulgaris): a clinical review. Phytother Res. 2019;33(3):504-23. [Crossref] [PubMed]
17. Xiao D, Liu Z, Zhang S, Zhou M, He F, Zou M, et al. Berberine derivatives with different pharmacological activities via structural modifications. Mini Rev Med Chem. 2018;18(17):1424-41. [Crossref] [PubMed]
18. Wang K, Feng X, Chai L, Cao S, Qiu F. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects. Drug Metab Rev. 2017;49(2):139-57. [Crossref] [PubMed]
19. Tan W, Zhong Z, Wang S, Suo Z, Yang X, Hu X, et al. Berberine regulated lipid metabolism in the presence of C75, compound C, and TOFA in breast cancer cell line MCF-7. Evid Based Complement Alternat Med. 2015;2015:396035. [Crossref] [PubMed] [PMC]
20. Guamán Ortiz LM, Croce AL, Aredia F, Sapienza S, Fiorillo G, Syeda TM, et al. Effect of new berberine derivatives on colon cancer cells. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2015;47(10):824-33. [Crossref] [PubMed]
21. Chen Q, Qin R, Fang Y, Li H. Berberine sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin through miR-93/PTEN/Akt signaling pathway. Cell Physiol Biochem. 2015;36(3):956-65. [Crossref] [PubMed]
22. Liu D, Meng X, Wu D, Qiu Z, Luo H. A natural isoquinoline alkaloid with antitumor activity: studies of the biological activities of berberine. Front Pharmacol. 2019;10:9. [Crossref] [PubMed] [PMC]
23. Hussein SAM, Barakat HH, Merfort I, Nawwar MAM. Tannins from the leaves of Punica granatum. Phytochemistry. 1997;45(4):819-23. [Crossref]
24. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agents. 2005;26(5):343-56. [Crossref] [PubMed] [PMC]
25. Zuo GY, Li Y, Han J, Wang GC, Zhang YL, Bian ZQ. Antibacterial and synergy of berberines with antibacterial agents against clinical multi-drug resistant isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Molecules. 2012;17(9):10322-30. [Crossref] [PubMed] [PMC]
26. Hong SB, Rhee MH, Yun BS, Lim YH, Song HG, Shin KS. Synergistic anti-bacterial effects of phellinus baumii ethyl acetate extracts and β-lactam antimicrobial agents against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Ann Lab Med. 2016;36(2):111-6. [Crossref] [PubMed] [PMC]
27. Du GF, Le YJ, Sun X, Yang XY, He QY. Proteomic investigation into the action mechanism of berberine against Streptococcus pyogenes. J Proteomics. 2020;215:103666. [Crossref] [PubMed]
28. Adamczak A, Ożarowski M, Karpiński TM. Antibacterial activity of some flavonoids and organic acids widely distributed in plants. J Clin Med. 2019;9(1):109. [Crossref] [PubMed] [PMC]
29. Tan J, Wang J, Yang C, Zhu C, Guo G, Tang J, et al. Antimicrobial characteristics of berberine against prosthetic joint infection-related Staphylococcus aureus of different multi-locus sequence types. BMC Complement Altern Med. 2019;19(1):218. [Crossref] [PubMed] [PMC]
30. Pierpaoli E, Cirioni O, Simonetti O, Orlando F, Giacometti A, Lombardi P, et al. Potential application of berberine in the treatment of Escherichia coli sepsis. Nat Prod Res. 2020;1-6. [Crossref] [PubMed]
31. Shi C, Li M, Muhammad I, Ma X, Chang Y, Li R, et al. Combination of berberine and ciprofloxacin reduces multi-resistant Salmonella strain biofilm formation by depressing mRNA expressions of luxS, rpoE, and ompR. J Vet Sci. 2018;19(6):808-16. [Crossref] [PubMed] [PMC]
32. Xu Y, Quan H, Wang Y, Zhong H, Sun J, Xu J, et al. Requirement for ergosterol in berberine tolerance underlies synergism of fluconazole and berberine against fluconazole-resistant Candida albicans isolates. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:491. [Crossref] [PubMed] [PMC]