Araştırma Makalesi/Original Article
Makale Dili "Türkçe"/Article Language "Turkish"

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Inula viscosa metanol ve hekzan ekstraktlarının antibakteriyel ve antikanserojenik etkilerinin incelenmesi

Investigation of the antibacterial and anticarcinogenic effects of *Inula viscosa* methanol and hexane extracts

Berna ERDAL[1] (ID), Bahar YILMAZ[2] (ID), Bensu BAYLAN[3] (ID)

ÖZET

Amaç: *Inula viscosa*, *Asteraceae* familyasına ait çok yıllık tıbbi bir bitkidir. Bu çalışmada, *I. viscosa*'dan elde edilen metanol ve hekzan ekstraktlarının antibakteriyel ve antikanserojenik aktivitelerinin incelenmesi amaçlandı.

Yöntem: *I. viscosa* metanol (1,56-800 mg/ml) ve hekzan (0,19-100 mg/ml) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon metodu ile test edildi. Standart referans suş olarak; *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* kullanıldı. Ekstraktların minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri her bir bakteri için mikrodilüsyon yöntemi ile yapıldı. MİK değeri, üremenin görülmediği en düşük ekstrakt konsantrasyonu olarak belirlendi. MİK sonrası tüm kuyucuklar için minimum bakterisit konsantrasyonları (MBK) saptandı. *I. viscosa*'nın antikanserojenik aktivitesi MTT testi ile araştırıldı. MDA-MB-231 ve HT-29 hücreleri ekstraktların IC_{50} değerlerinde akridin oranj ve propidium iyodür ile boyanarak canlı, apoptotik ve nekrotik hücreler belirlendi.

ABSTRACT

Objective: *Inula viscosa* is a perennial medicinal plant belonging to the *Asteraceae* family. This study aimed at investigating the antibacterial and anticarcinogenic activities of methanol and hexane extracts derived from *I. viscosa*.

Methods: The antibacterial activity of different concentrations of *I. viscosa* methanol (1.56-800 mg/ml) and hexane (0.19-100 mg/ml) extracts was tested using the disc diffusion method. *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* were used as standard reference strains. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of the extracts were made for each bacteria using the microdilution method. MIC value was determined as the lowest extract concentration at which growth was not observed. Minimum bactericide concentrations (MBC) were determined for all wells after MIC. The anticarcinogenic activity of *I. viscosa* was examined using the MTT test. MDA-MB-231 and HT-29 cells were stained with acridine orange and propidium iodide at the IC_{50} values of the extracts to determine the viable, apoptotic and necrotic cells.

* Bu çalışma International Congress of Medicine and Health Sciences (26-28 Nisan, 2021) ve 7. International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences (3-4 Eylül, 2021) kongrelerinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

[1]Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Tekirdağ
[2]Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tümör Biyolojisi ve İmmünoloji AD, Tekirdağ
[3]Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Tekirdağ

İletişim / Corresponding Author : Berna ERDAL
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Kampüs Caddesi No:1, 59030 Merkez / Tekirdağ - Türkiye
E-posta / E-mail : berdal@nku.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 06.12.2021
Kabul Tarihi / Accepted : 17.02.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.55798

Erdal B, Yılmaz B, Baylan B. *Inula viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının antibakteriyel ve antikanserojenik etkilerinin incelenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(1): 133 - 144

Bulgular: Metanol ekstraktının *L. monocytogenes*, *M. luteus*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* için zon çapları sırasıyla; 8, 16, 7 ve 9 mm olarak ölçüldü. Hekzan ekstraktının ise *M. luteus*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* için zon çapları sırasıyla 14, 7 ve 9 mm olarak belirlendi. Metanol ekstraktının MİK değerleri *M. luteus* için 25 mg/ml, *L. monocytogenes* ve *K. pneumoniae* için 200 mg/ml ve *E. coli* için ise 400 mg/ml olduğu bulundu. Hekzan ekstraktının MİK değerleri *L. monocytogenes*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* için 400 mg/ml, *M. luteus* için 100 mg/ml olduğu bulundu. MBK değerlerinin MİK değerleri ile benzer olduğu görüldü. IC50 değerleri metanol ekstraktının MDA-MB-231 ve HT-29 hücreleri için sırasıyla 25 mg/ml ve 200 mg/ml, hekzan ekstraktının 6,25 mg/ml ve 12,5 mg/ml olarak belirlendi. Konsantrasyon artışına bağlı olarak MDA-MB-231 ve HT-29 hücrelerinde nekrotik ve erken apoptotik hücrelerin varlığı görüldü.

Sonuç: *I. viscosa*'nın metanol ve hekzan ekstraktlarının çalışılan bakteriler üzerine antibakteriyel, MDA-MB-231 ve HT-29 hücreleri üzerine antikanserojenik aktivitesinin olduğu bulundu. Bu ekstraktların farklı kanser hücre hatları ve bakteri suşları üzerine etkilerinin yapılacak başka çalışmalarla gösterilmesinin tamamlayıcı tıp alanına katkı sağlayacağı düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: *Inula viscosa*, Antibakteriyel, Antikanserojenik

Results: Zone diameters of the methanol extract for *L. monocytogenes*, *M. luteus*, *E. coli* and *K. pneumoniae* were 8, 16, 7 and 9 mm, respectively. Zone diameters of the hexane extract for *M. luteus*, *E. coli* and *K. pneumoniae* were 14, 7 and 9 mm, respectively. MIC values of the methanol extract were 25 mg/ml for *M. luteus*, 200 mg/ml for *L. monocytogenes* and *K. pneumoniae*, and 400 mg/ml for *E. coli*. MIC values of the hexane extract were 400 mg/ml for *L. monocytogenes*, *E. coli* ve *K. pneumoniae*, and 100 mg/ml for *M. luteus*. MBC values were similar to MIC values. IC50 values for MDA-MB-231 and HT-29 cells were 25 mg/ml and 200 mg/ml for the methanol extract, and 6.25 mg/ml and 12.5 mg/ml for the hexane extract, respectively. Depending on increased concentration levels, the presence of necrotic and early apoptotic cells was observed among MDA-MB-231 and HT-29 cells.

Conclusion: Methanol and hexane extracts of *I. viscosa* were found to have antibacterial effects on the studied bacteria and anticarcinogenic activity on MDA-MB-231 and HT-29 cells. Conducting further studies to demonstrate the effects of these extracts on different cancer cell lines and bacterial strains will contribute to the field of complementary medicine.

Key Words: *Inula viscosa*, antibacterial, anticarcinogenic

GİRİŞ

Tıbbi bitkiler, fitokimyasal ve biyolojik özelliklerinden dolayı potansiyel terapötik ajanlar olarak halen araştırma konusu olmaya devam etmektedir. Özellikle küresel bir sağlık sorunu haline gelen antibiyotik direnci nedeniyle bu bitkilerin antimikrobiyal özellikleri araştırılmaktadır (1). Doğada tabii olarak yetişen bazı bitkilerin özütleri ve uçucu yağlarının antibakteriyel aktivitesinin varlığı çeşitli çalışmalarda gösterilmektedir (2,3).

Kanserle mücadelede kemoterapi en yaygın kullanılan yöntem olmasına rağmen bazı dezavantajlar (tedaviye yanıt alınamaması, ciddi toksisite ve çoklu ilaç direnci vb.) başarı yüzdesini düşürmektedir. Kemoterapideki bu sınırlılıklar,

kanser hücrelerinde apoptoz ve sinyal yolakları üzerine etkili alternatif doğal tedavilerin araştırıldığı çalışmaların sayısını giderek arttırmaktadır (4,5).

Güney Avrupa ile Güneybatı Asya floraları arasında köprü olması nedeniyle ülkemiz, terapötik amaçlı kullanılan endemik türler açısından oldukça zengindir (6). *Asteraceae* familyasına ait olan *Inula* bitkisinin dünya genelinde yaklaşık 100 türü olduğu bilinmektedir. Türkiye'de ise yedisi endemik olmak üzere 27 *Inula* türü bulunmaktadır. Bu türlerin çoğu kauçuk kaynağı, ilaç, yağ, sebze, pestisit ve peyzaj gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (7,8). Son yıllarda *Inula* türleri biyolojik aktiviteleri nedeniyle bilim dünyasının dikkatini çekdi ve kimyasal özellikleri araştırıldığında yapısında birçok önemli biyoaktif bileşen içerdiği bulundu. Bu bileşenler; terpenik bileşikler (monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler ve triterpenler), flavonoidler, glikolipitler ve antranilik asit türevleridir (9,10). Bu bileşenlerin antiproliferatif, antioksidan, antitümoral, antimikrobiyal ve sitotoksik etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (11-13). Geleneksel tıpta; mide ülseri, anemi, diyabet, bronşiyal enfeksiyon, karaciğer ve deri hastalıklarının tedavisinde bu bitki yaygın olarak kullanılmaktadır (14-17).

Inula türlerinden biri olan ve halk arasında yapışkan anduz otu olarak bilinen *I. viscosa*, Akdeniz ve Ege bölgesinde yetişen tıbbi bir bitkidir. Ülkemizde farklı coğrafik bölgelerde yetişen *I. viscosa*'nın antitümoral ve sitotoksik etkileri farklı kanser türlerinde araştırılmaktadır (18,19). Aynı zamanda sahip olduğu flavonoidler ve terpenoidler gibi sekonder metabolitler sayesinde antimikrobiyal aktivite gösterdiği de dikkati çekti (20,21).

Bu çalışmada; *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının; *L. monocytogenes*, *M. luteus*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* standart referans bakteri suşları üzerine antibakteriyel, MDA-MB-231 (ATCC HTB-26™) meme kanseri ve HT-29 (ATCC HTB-38™) kolon kanseri hücre hatları üzerine antikanserojenik etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

I. viscosa ekstraktının hazırlanması

Manisa'nın Akhisar ilçesinden toplanan *I. viscosa*'nın aerial yapıları kurutulup toz haline getirilerek ezildi. Öğütülmüş bitki materyalleri, dönen bir çalkalayıcıda metanol (Katalog No: 106009; Merck, Almanya) ve hekzan (Katalog No: 10437; Merck, Almanya) çözeltileri kullanılarak 24 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi (22). Ekstraktlar, 40°C'de buharlaştırıldı ve daha sonra filtre kağıdından süzülerek liyofilize edildi ve deneysel kullanım için -20°C'de muhafaza edildi

Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi

Bakteri suşları

Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesinde Gram pozitif bakterilerden: *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *M. luteus* ATCC 10420; Gram negatif bakterilerden: *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13883 standart bakteri suşları kullanıldı.

Minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) testi

Her bir bakteri suşu için MİK değerleri, katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (CAMHB) (Merck) kullanılarak EUCAST (2020) yönergelerine göre önerilen mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi (23). *I. viscosa* metanol (800-1,56 mg/ml) ve hekzan (100-0,19 mg/ml) ekstraktlarının farklı konsantrasyonları 96 kuyucuklu plakalara dilüe edilerek uygulandı. Bakteriyel süspansiyonlar 0.5 McFarland ($1,5x10^8$ kob (koloni oluşturan birim) /ml) türbidite standardında uygun miktarlarda hazırlandı ve 10^5 kob /ml'ye dilüe edilerek her kuyucuğa 10 µl eklendi. Plakalar, 37°C' de 18-20 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra spektrofotometre ile 630 nm dalga boyunda okutularak değerlendirmesi yapıldı. Üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi. Her test üç kez tekrar edildi.

Minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) testi

MİK testinde üreme gözlenmeyen kuyucuklardan alınan 2 µl örnekler Mueller Hinton Agara (Merck) ekildi. Besiyeri plakları 37°C'de 18-20 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda üremeler

değerlendirilerek, mikrodilüsyon plaklarındaki üreme gözlenmeyen kuyucuklar ile karşılaştırıldı. Üreme gözlenmeyen bakteri konsantrasyonları MBK değeri olarak belirlendi.

Disk difüzyon metodu

Bakteri suşları %5 koyun kanlı agara (BES-LAB) inoküle edildikten sonra 37°C'de 18-20 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası bakteri yoğunluğu Mueller Hinton Broth'ta 0,5 McFarland olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra Mueller Hinton Agar'a bakteri süspansiyonları inoküle edildi. *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonları 6 mm çaplı No.3 Whatman disklere 100'er mikrolitre emprenye edildi. Diskler inoküle edilen petrilerin (150 mm) yüzeyine yerleştirildi ve 18-20 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Pozitif kontrol olarak Gentamicin (10 µg, Katalog No: CT0024B; Oxoid) diskleri kullanıldı. İnkübasyon sonunda zon çapları (milimetre) ölçüldü. Her test üç kez tekrar edildi.

Antitümoral aktivitenin belirlenmesi

Hücreler ve kültür koşulları

Antitümoral aktivitenin belirlenmesinde MDA-MB-231 ve HT-29 hücre hatları kullanıldı. Hücreler %10 fetal sığır serumu (fetal bovine serum, FBS) (Gibco), %1 L-glutamine (Gibco), %1 penicilin/streptomycin (Gibco) içeren RPMI-1640 (Gibco) besi ortamında 37°C sıcaklıkta %5 CO_2'li inkübatörde kültüre edildi.

Hücre canlılığı analizi

Hücre canlılığını değerlendirmek için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi kullanıldı. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara $3x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 100 µl ekildi ve %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında uygun dozlarda (metanol ekstraktı için: 800-1,56 mg/ml; hekzan 100-0,19 mg/ml) ekstrakt ve kemoterapötik ajan sisplatine (500-0,98 µg/ml) (MCE) maruz bırakıldı. 24 saat inkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyeri çekilerek yerine 100 µl fenol kırmızısı içermeyen RPMI (Sigma) eklendi. Daha sonra 1 mg/ml MTT (Katalog No: V13154; Vybrant® Invitrogen, ABD) reaktifinden her kuyucuğa 10 µl eklendi ve 4 saat 37°C' de %5'lik CO_2'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda süpernatant atıldı ve formazan partikülleri dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma) kullanılarak çözündürüldü. Plaklar 570 nm dalga boyunda Multiskan GO mikroplaka okuyucu (ThermoScientific, Waltham, ABD) ile optik yoğunlukları (OD) ölçüldü. Canlı hücrelerin yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: (%) = [100 × (örnek abs)/ (kontrol abs)] (24). Deney, üç kez tekrar edildi.

Akridin oranj / propidyum iyodür (AO/PI) floresan boyama

I. viscosa'nın canlı ve ölü hücreler üzerine etkisini gözlemlemek için 10 g sodyum-etilendiamintetraasetik asit (Na-EDTA), 4 mg propidium iyodür (PI) (Thermo Fisher Scientific) ve 50 ml FBS, 4 mg akridin oranj (AO) (Thermo Fisher Scientific) (2 ml 99% ETOH içinde çözülmüş) iyice karıştırıldı. Son hacim 200 ml olacak şekilde steril damıtılmış su eklenerek pipetaj yapıldı (25). Hücre sayısı $3x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara üç tekrarlı ekildi. Hücreler tutunması için 24 saat 5% CO_2 içeren 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Belirlenen dozlarda *I. viscosa* ve sisplatin ile muamele edilen hücreler inkübe edildikten sonra AO/PI karışımından her kuyucuğa 10 µl eklenerek 5 dakika beklenildi. Farklı apoptotik özelliklere sahip hücreler floresan mikroskop (Leica, Almanya) kullanılarak morfolojik olarak değerlendirildi.

Bu çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:29.06.2021 ve Karar No: 2021.192.06.22).

BULGULAR

Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Çalışmada, *I. viscosa* metanol (800-1,56 mg/ml) ve hekzan (100-0,19 mg/ml) ekstraklarının farklı konsantrasyonlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644, *M. luteus* ATCC 10240, *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883 standart referans suşları üzerine antibakteriyel aktivitesi MİK ve disk difüzyon

yöntemi ile test edildi. Tablo 1'de gösterildiği gibi, *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının en düşük MİK ve MBK konsantrasyonları *M. luteus*'ta görüldü. Ayrıca, metanol ve hekzan ekstraktlarının MİK ve MBK sonuçlarının uyumlu olduğu bulundu.

I. viscosa metanol ve hekzan ekstraktlarının disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite sonuçları Tablo 2 ve Şekil 1'de verildi. Kullanılan suşlarda farklılık görülmekle birlikte; metanol ekstraktının 800, 400 ve 200 mg/ml konsantrasyonlarda, hekzan ekstaraktının ise 100 ve 50 mg/ml konsantrasyonlarda antibakteriyel aktivite sergilediği görüldü. Her iki ekstrakta en duyarlı olan bakterinin *M. luteus* olduğu belirlendi. Pozitif kontrol olarak kullanılan gentamisin EUCAST (2020) kriterlerine göre, standart bakteri suşlarında yüksek oranda duyarlılık gösterdi (Tablo 2, Şekil 1).

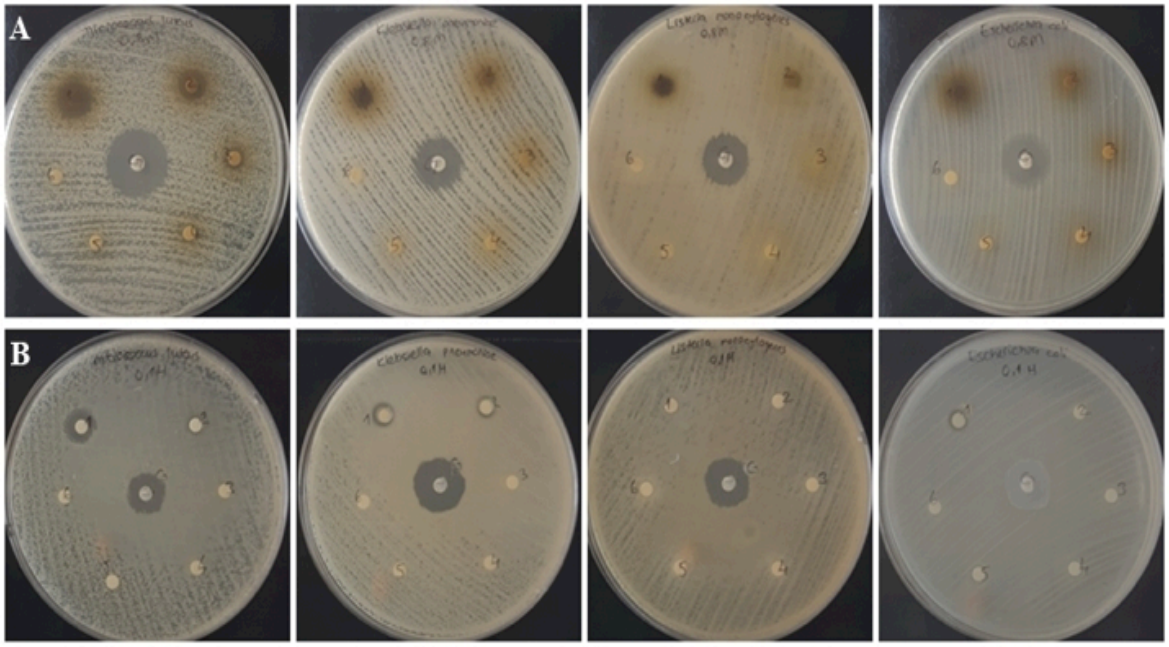
Tablo 1. *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının MİK ve MBK sonuçları (mg/ml)

Referans Standart Bakteri Suşu	Metanol Ekstraktı		Hekzan Ekstraktı	
	MİK	MBK	MİK	MBK
L. monocytogenes	200	200	400	400
M. luteus	25	25	100	200
E. coli	400	800	400	400
K. pneumoniae	200	200	400	400

Tablo 2. *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının inhibisyon zon çapları (mm)

Bakteri Suşları	İnhibisyon Zonları (mm) (Ortalama ± standart sapma)					
	Metanol Ekstraktı			Hekzan Ekstraktı		Gentamisin
	800 mg/ml	400 mg/ml	200 mg/ml	100 mg/ml	50 mg/ml	10 µg/ml
L. monocytogenes	8,033±0,075	ZY	ZY	ZY	ZY	21,027±0,140
M. luteus	16,06±0,161	13,013±0,162	9,077±0,120	14,01±0,185	8,003±0,130	29,997±0,176
E. coli	7,03±0,137	ZY	ZY	7,013±0,130	ZY	24,04±0,145
K. pneumoniae	9,043±0,148	7,047±0,163	ZY	9,017±0,141	8,007±0,155	21,993±0,156

ZY: Test edilen bakterilere karşı ekstrakt zon oluşturmadı.

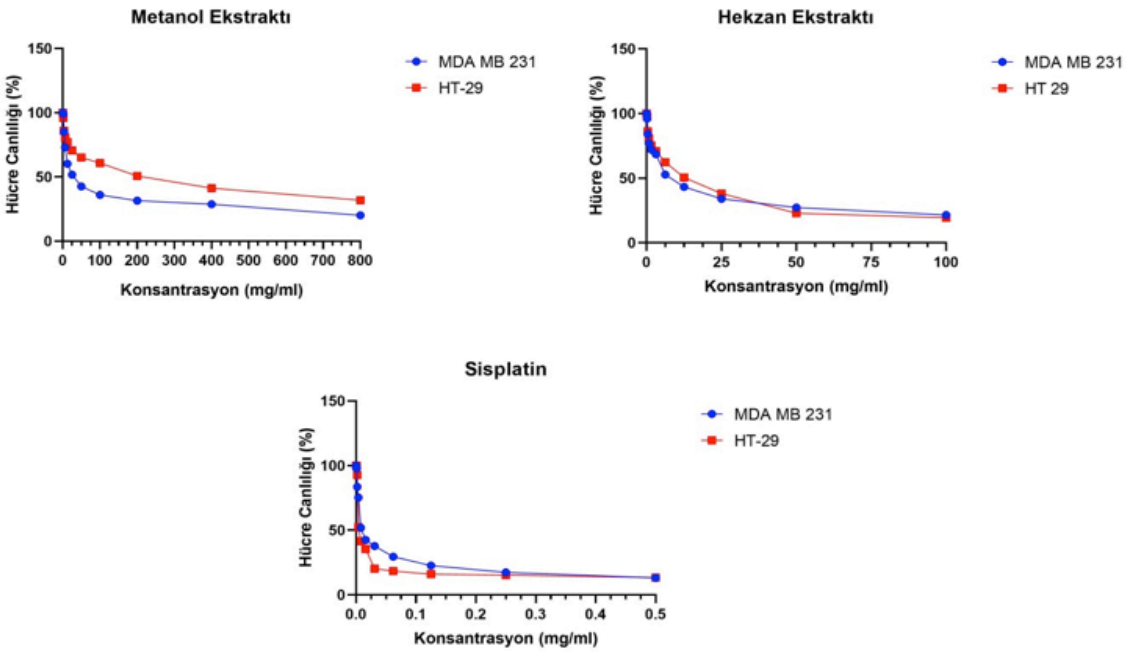


Şekil 1. *I. viscosa*'nın altı farklı konsantrasyonunun (A: Metanol Ekstraktı 800-25 mg/ml; B: Hekzan Ekstraktı 100-3,125 mg/ml) disk difüzyon metodu ile iki Gram pozitif ve iki Gram negatif bakteriye karşı antibakteriyel aktivitesi

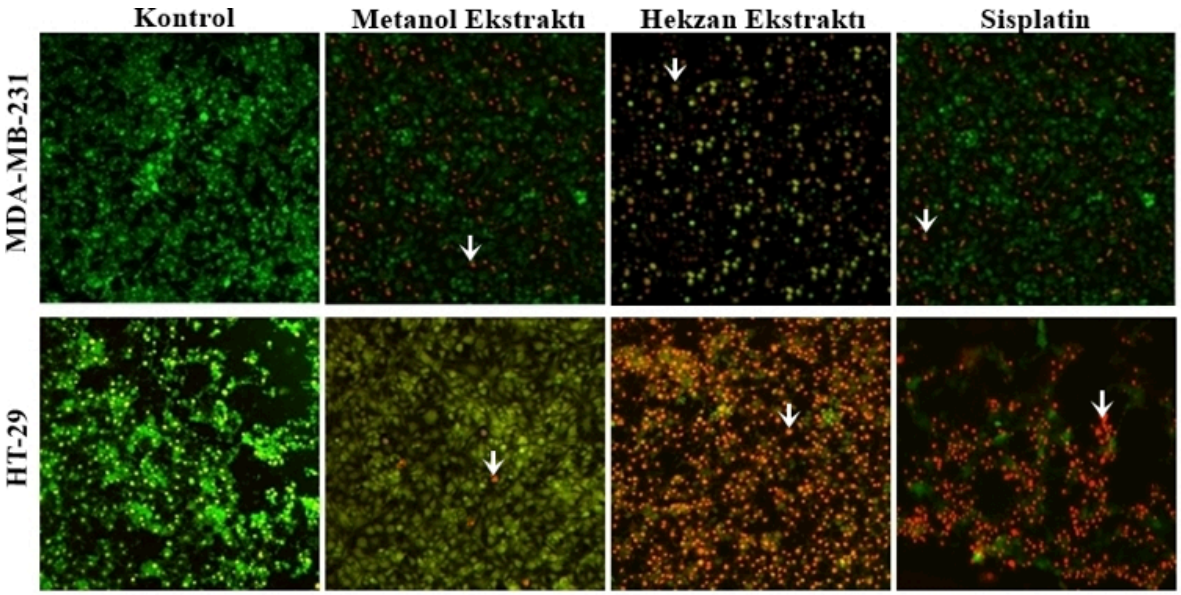
Antikarsinojenik aktivitenin belirlenmesi

MTT testi sonucunda, *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının MDA-MB-231 ve HT-29 hücreleri ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında konsantrasyona bağlı olarak kanser hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edildi. MDA-MB-231 hücreleri üzerine *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının inhibitör konsantrasyonları (IC50) sırasıyla 25 mg/ml ve 6,25 mg/ml olarak bulundu. HT-29 hücrelerinde ise *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının IC50 değerleri sırasıyla 200 mg/ml ve 12,5 mg/ml olduğu görüldü. MDA-MB-231 ve HT-29 hücreleri aynı koşullar altında sisplatin ile muamele edildiğinde IC50 değerleri sırasıyla 0,008 mg/ml ve 0,004 mg/ml olduğu bulundu (Şekil 2). Yapılan MTT analizi sonucunda, *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının HT-29 hücrelerine kıyasla MDA-MB-231 hücrelerine karşı önemli anti-proliferatif aktiviteye sahip olduğu görüldü. Ayrıca; iki hücre hattı üzerinde de hekzan ekstraktının metanol ekstraktına kıyasla daha etkili olduğu belirlendi.

Çalışmada, *I. viscosa* ekstraktlarının ve sisplatinin apoptotik etkinliğinin belirlenebilmesi için IC50 değerlerinde AO/PI floresan boyama metodu uygulandı. Yeşil floresan veren hücreler AO ile boyanan canlı hücreler, turuncu/kırmızı floresan veren hücreler ise PI ile boyanan apoptotik hücrelerdir. *I. viscosa* ekstraktları uygulanan hücrelerde apoptoza uğrayan hücre sayısının, kontrol hücrelerine kıyasla yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 3). Ayrıca, MDA-MB-231 ve HT-29 hücrelerinin hekzan ekstraktı ile muamelesi sonrasındaki apoptotik hücre popülasyonlarının fazla olması MTT bulgularını desteklemektedir.



Şekil 2. *I. viscosa* ekstraktları ve sisplatinin MDA-MB-231 ve HT-29 hücre canlılığı üzerine etkileri



Şekil 3. *I. viscosa* ekstraktları ve sisplatin uygulanmış MDA-MB-231 ve HT-29 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri (40x). Şekil üzerindeki oklar apoptotik hücreleri göstermektedir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitki özütleri, içeriğinde bulunan aktif bileşikler sayesinde alternatif doğal tedavilerin temelini oluşturmaktadır. Son yıllarda, yaygın antibiyotik kullanımının artması sonucu gelişen antibakteriyel direnç ile mücadeleye yönelik aktif bitki ekstraktlarıyla yapılan in vitro çalışmalar önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada, iki Gram pozitif (*L. monocytogenes* ve *M. luteus*), iki Gram negatif (*E. coli* ve *K. pneumoniae*) bakteri üzerine *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının antibakteriyel etkinliği araştırıldı. Çalışılan bakteriler üzerine hem metanol hem de hekzan ekstraktının değişen oranlarda antibakteriyel etkinlik gösterdi. En iyi etki ise *M. luteus* suşunda bulundu.

I. viscosa ekstraktlarının farklı bakteriler üzerine antimikrobiyal etkinliğini araştıran benzer çalışmalar bulunmaktadır (20,26-30). Yapılan bir çalışmada; *I. viscosa*'nın aerial yapılarından elde edilen metanol ekstraktının 3,125-50 mg/ml konsantrasyonlarındaki antibakteriyel etkisi, MİK ve disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı. *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus faecalis* suşları kullanılarak yapılan MİK testi sonucu ekstraktın en etkili olduğu bakterinin *E. faecalis* (6,25 mg/ml), disk difüzyon yöntemi sonucu ise *E. coli* (25 mg/ml) olduğu bulundu (28). *I. viscosa*'nın metanol, etanol ve su ile hazırlanan ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin incelendiği başka bir çalışmada; *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* bakterilerinin 250 µg/ml konsantrasyonda metanol ekstraktına karşı duyarlı olduğu sonucuna varıldı (29). Benzer bir çalışmada, *I. viscosa* metanol ekstraktının (15-480 mg/ml) disk difüzyon metoduyla antibakteriyel aktivitesi araştırıldı, bu ekstrakta en duyarlı bakterinin *Pseudomonas aeruginosa* olduğu tespit edildi (30). Tüm bu çalışma sonuçlarına bakılarak, *I. viscosa*'nın farklı ekstraktlarının değişen oranlarda hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği görüldü..

Günümüzde kansere karşı yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesine ve uygulanmasına rağmen mevcut kanser tedavileri yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden tümör gelişimini inhibe edecek etkili, yan etkisi az ve/veya olmayan yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Son yarım asırdan beri bitkilerin sahip olduğu aktif bileşiklerin türevleri, modern klinik uygulamalarda kansere karşı kullanılmaktadır (31).

Bu çalışmada, MDA-MB-231 ve HT-29 hücreleri üzerine *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının IC50 konsantrasyonları belirlendi. Her iki hücre üzerine hekzan ekstraktının metanol ekstraktına kıyasla daha güçlü antikanserojenik aktiviteye sahip olduğu bulundu. Ayrıca her iki ekstraktın da HT-29 hücrelerine kıyasla MDA-MB-231 hücrelerine karşı önemli anti-proliferatif aktiviteye sahip olduğu görüldü. Ek olarak IC50 konsantrasyonlarında apoptoza uğrayan hücre sayısının kontrol hücrelerine kıyasla yüksek olduğu tespit edildi.

I. viscosa ekstraktlarının farklı hücre hatları üzerine antikanserojenik etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar mevcut olmasına rağmen bu çalışmada kullanılan hücre hatları ile yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmadı (32-36). Talib ve Mahasneh (34), *I. viscosa*'nın metanol, hekzan ve kloform ekstraktlarının Hep-2 (larinks karsinoması), MCF-7 (meme epitelyal adenokarsinoması) ve vero (Afrikan yeşil maymunu böbreği) hücre hatları üzerine antikanserojenik etkilerini araştırdı ve MCF-7 hücrelerine karşı metanol ekstraktının (IC50: 15,78 µg/ml) oldukça etkili olduğunu buldular. Yapılan başka bir çalışmada, *I. viscosa*'nın hekzan ve metanol ekstraktlarının MCF-7/S ve HT-1080 hücre hatları üzerine olan etkilerine bakıldı ve çalışma sonunda hekzan ekstraktının her iki hücre hattına da yakın IC50 değerlerinde (MCF-7/S 14,68 µg/ml; HT-1080 15,67 µg/ml) antikanserojenik aktivite gösterdiği tespit edildi (35). *I. viscosa*'nın sulu ekstrelerinin HCT116 ve Colo320 hücre hatları üzerine antikanserojenik etkilerinin araştırıldığı

diğer bir çalışmada, kolorektal kanser hücrelerine doz ve zamana bağlı olarak etkili olduğu saptandı (36). Bahsedilen çalışma sonuçlarına bakılarak, *I. viscosa* ekstraktlarının farklı hücre hatları üzerine antikarsinojenik aktivite gösterdiği sonucuna varılabilir.

Sonuç olarak; *I. viscosa*'nın metanol ve hekzan ekstraktlarının patojen mikroorganizmalar üzerine antibakteriyel, meme ve kolon kanser hücreleri üzerine ise antikarsinojenik özelliklerinin araştırılmasının klinik çalışmalara yön verecek olan alternatif tedaviye yenilikçi bir yaklaşım getireceği kanısındayız. MDA-MB-231 ve HT-29 kanser hücre hatlarına ek olarak sağlıklı meme ve kolon hücre hattı üzerine bu ekstraktların etkinliğinin gösterilmemesi çalışmanın kısıtlayıcı yanıdır. *I. viscosa*'nın antibakteriyel ve antikanserojenik etkinliğinin tedavi sürecine olan katkıları hakkında yeterli bilgi sağlayabilmek adına daha fazla sayıda suşun ve/veya hücre hattının dahil edildiği geniş ölçekli çalışmalar ile bu çalışma sonuçlarının desteklenmesi gerekmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:29.06.2021 ve Karar No: 2021.192.06.22).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Tollu G, Erdoğan Eliuz EA. In vitro examination of toothpastes with Cinnamomum cassia methanolic extract. Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78 (2): 197-204.
2. Gao J, Yu H, Guo W, Kong Y, Gu L, Li Q, et al. The anticancer effects of ferulic acid is associated with induction of cell cycle arrest and autophagy in cervical cancer cells. Cancer Cell Int, 2018; 13 (18): 102-10.
3. Mahmoudi H, Hosni K, Zaouali W, Amri I, Zargouni H, Hamida NB, et al. Comprehensive phytochemical analysis, antioxidant and antifungal activities of Inula viscosa Aiton leaves. J Food Saf, 2016; 36 (1): 77–88.
4. Yılmaz B, Erdal B. Anti-cancer activities of curcumin and propolis extracts on MCF-7 breast cancer cell line model. Med Sci, 2020; 9 (4): 877-84.
5. Colak DK, Egeli U, Eryilmaz IE, Aybastier O, Malyer H, Cecener G, et al. The Anticancer effect of Inula viscosa methanol extract by miRNAs' re-regulation: an in vitro study on human malignant melanoma cells. Nutr Cancer, 2021; 11: 1-14.
6. Mitić VD, Ilić MD, Stankov Jovanović VP, Djordjevic AS, Marković MS, Stojanović GS. Volatiles composition and antioxidant activity Inula oculus-christi L. from Serbia. Nat Prod Res, 2020;34(18):2698-2701.
7. Tepe HD, Ugurlu A, Yazgan I. Determination of phenolic compounds, organic volatile molecules and anti-cancer properties in Inula viscosa L., Viscum album L. and Raphanus sativus L. Sakarya Uni J Sci, 2021; 647-62.
8. Karanović DS, Zorić LN, Perić RD, Lazarević JM, Luković JŽ. Anatomical and micro-morphological analysis of the fruit and vegetative organs of Inula oculus-christi L. in the Pannonian part of Serbia. Matica Srpska J. Nat. Sci, 2016; 131: 55-62.
9. Qneibi M, Hanania M, Jaradat N, Emwas N, Radwan S. Inula viscosa (L.) Greuter, phytochemical composition, antioxidant, total phenolic content, total flavonoids content and neuroprotective effects. Eur J Integr Med,, 2021; 42. 101291.
10. Topakci N. Sticky elecampane , Inula viscosa (L .) aiton (Asteraceae). Int J Agric Innov Res, 2016; 5: 413–6.
11. Taviano MF, Rashed K, Filocamo A, Cacciola F, Dugo P, Mondello L, et al. Phenolic profile, antioxidant and antimicrobial properties of a hydroalcoholic extract obtained from the leaves of Ficus vasta Forssk. (Moraceae) growing in Egypt. BMC Compl Alt Med, 2018; 18 (1): 161.
12. Alalan L, Al-Shammaa I, Al-Nouri AS. Analysis of the chemical composition of essential oil extracted from Syrian Inula viscosa (L). J Chem Pharm Res, 2015; 7: 861–4.
13. Ren Y, Yu J, Douglas Kinghorn A. Development of anticancer agents from plant-derived aesquiterpene lactones. Curr. Med. Chem, 2016; 23, 2397–2420.
14. Marino A, Zengin G, Nostro A, Ginestra G, Dugo P, Cacciola F, et al. Antimicrobial activities, toxicity and phenolic composition of Asphodeline anatolica E. Tuzlaci leaves extracts from Turkey. Nat Prod Res, 2016; 30 (22): 2620–3.

15. Adzu B, Balogun OS, Sérgio ED, Donizeti AI, Mendes SR, Wagner SA, et al. Evaluation of the safety, gastroprotective activity and mechanism of action of standardised leaves infusion extract of Copaifera malmei Harms., J Ethnopharmacol, 2015; 175: 378-89.

16. El Yaagoubi OM, Lahmadi A, Bouyahya A, Filali H, Samaki H, El Antri S, et al. Antitumor effect of Inula viscosa extracts on DMBA-induced skin carcinoma are mediated by proteasome inhibition. BioMed Research International, 2021; 6687589.

17. El Omari N, El Menyiy N, Zengin G, Goh BH, Gallo M, Montesano D, et al. Anticancer and anti-inflammatory effects of tomentosin: cellular and molecular mechanisms. Separations, 2021; 8 (11), 207-21.

18. Keskin Çavdar H, Yıldırım ZI, Fadıloğlu S. Evaluation of the effect of geographical origin and extraction solvents on bioactive and antioxidative properties of Inula viscosa L. grown in Turkey by chemometric approach. Eur Food Res Technol, 2021; 1-9.

19. Deveci E, Tel Çayan G, Karakurt S, Duru ME. Anti-colorectal cancer effects of medicinal plants: Euphorbia helioscopia, Ferula elaeochytris, and Sideritis albiflora. Commagene J Biol, 2021; 73-7.

20. Gökbulut A, Özhana O, Satılmiş B, Batçioğlu K, Günal S, Şarer E. Antioxidant and antimicrobial activities, and phenolic compounds of selected Inula species from Turkey. Nat Prod Commun, 2013; 8 (4): 475-8.

21. Bayar Y, Genc N. Total Phenolic, Total Flavonoids, antioxidant and antifungal activity of Inula viscosa extracts from Turkey. Indian Journals, 2021; 46-54.

22. Lee YH, Lee NK, Paik HD. Antimicrobial characterization of Inula britannica against Helicobacter pylori on gastric condition. J. Microbiol Biotechnol, 2016; 26 (6): 1011-7.

23. The Europen Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretatron of MİCs and zone diameters. Version 11.0, 2021.

24. Karakaş D, Arı F, Ulukaya E. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. Turk J Biol, 2017; 41: 919-25.

25. Seber ES, Sirin DY, Yetisyigit T, Bilgen T. Piperlongumine increases the apoptotic effect of doxorubicin and paclitaxel in a cervical cancer cell line. Niger J Clin Pract, 2020; 23 (3): 386-91.

26. Karygianni L, Cecere M, Skaltsounis AL, Argyropoulou A, Hellwig E, Aligiannis N, et al. High-level antimicrobial efficacy of representative Mediterranean natural plant extracts against oral microorganisms. BioMed Res Int, 2014; 839019.

27. Al-Snafi AE. Chemical constituents and pharmacological effect of Inula graveolens (Syn: Dittrichia graveolens)-A review. Indo American J Pharm Sci, 2018: 5 (4); 2183-90.

28. Larbi KS, Meddah B, Meddah ATT, Sonnet P. The Antibacterıal effect of two medıcınal plants Inula viscosa, Anacyclus valentınus (Asteraceae) and their synergıstıc interactıon with antibiotic drugs. J Fundam Appl Sci, 2016; 8 (2): 244-55.

29. Mohti H, Taviano MF, Cacciola F, Dugo P, Mondello L, Marino A, et al. Inula viscosa (L.) Aiton leaves and flower buds: effect of extraction solvent/technique on their antioxidant ability, antimicrobial properties and phenolic profile. Nat Prod Res, 2020; 34 (1): 46-52.

30. Najefi RB, Asghari G, Abbas A. Antimicrobial activities of phenolic and non-phenolic fractions of Inula viscosa (L) Extract. J Biol Act Prod Nat, 2011; 1 (5-6): 325-331.

31. Mehta RG, Murillo G, Naithani R, Pen X. Cancer chemoprevention by natural products: How far have we come? Pharm Res, 2010; 27: 950-61.

32. Hepokur C, Budak Y, Karayel HB, Selvi B, Yaylım İ. Investigation of cytotoxic effects of Inula viscosa extract Cumhuriyet Sci J, 2019; 40 (3): 578-82.

33. Fang XM, Liu B, Liu YB, Wang JJ, Wen JK, Li BH, et al. Acetylbritannilactone suppresses growth via upregulation of krüppel-like transcription factor 4 expression in HT-29 colorectal cancer cells. Ocol Rep, 2011; 26: 1181-87.

34. Talib WH, Mahasneh AM. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. Sci Pharm, 2010; 78 (1): 33-46.

35. Merghoub N, El Btaouri H, Benbacer L, Gmouh S, Trentesaux C, Brassart B, et al. Inula viscosa extracts ınduces telomere shortening and apoptosis in cancer cells and overcome drug resistance. Nutr Cancer, 2016; 68 (1): 131-43.

36. Bar-Shalom R, Bergman M, Grossman S, Azzam N, Sharvit L, Fares F. Inula viscosa Extract inhibits growth of colorectal cancer cells in vitro and in vivo through induction of apoptosis. Front Oncol, 2019; 9: 227.