

**BAZI DOĞAL BİLEŞİKLERİN BİYOFİLM
OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN BAĞIRSAK
HÜCRELERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Songül GÖNEL

Eskişehir 2019

**BAZI DOĞAL BİLEŞİKLERİN BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNE
ETKİLERİNİN BAĞIRSAK HÜCRELERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRILMASI**

Songül GÖNEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Aralık 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Songül GÖNEL'in “Bazı Doğal Bileşiklerin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkilerinin Bağırsak Hücreleri Üzerinde Araştırılması” başlıklı tezi 30/12/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Ünvanı Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışman) : Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK

Üye : Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Üye : Doç. Dr. Gözde KILIÇ

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

FINAL APPROVAL FOR THESIS

This thesis titled “Investigation of the effects of some natural compounds on the formation of biofilm on intestinal cells” has been prepared and submitted by Songül GÖNEL in partial fulfillment of the requirements in “Anadolu University Directive on Graduate Education and Examination” for the Degree Master of Science in Pharmaceutical Microbiology Department has been examined and approved on 30/12/2019.

Committee Member

Signature

Member (Supervisor) : Assoc. Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK

Member : Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Member : Assoc. Prof. Dr. Güzde KILIÇ

Director

Graduate School of Health Sciences

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

ÖZET

BAZI DOĞAL BİLEŞİKLERİN BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN BAĞIRSAK HÜCRELERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRILMASI

Songül GÖNEL

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aralık 2019

Danışman: Doç Dr. Zerrin CANTÜRK

Mikroorganizmaların planktonik ve biyofilm formları; gıda, sağlık, tarım ve endüstri gibi alanlarda potansiyel bir tehdit kaynağı oluşturmaktadır. Biyofilm oluşumu, mikroorganizmaların planktonik formdan biyofilm formuna geçen süreçte gerçekleşmektedir. Son yıllarda biyofilm oluşumu ile ilgili problemler giderek artmaktadır. Özellikle bağışıklığı bozulmuş kişilerde, fırsatçı patojenlerin oluşturduğu biyofilm kökenli enfeksiyonlar sıklıkla görülmektedir.

Tez kapsamında, doğal bileşiklerden gallik asit, resveratrol ve kurkuminin *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* ve *E. coli* bakterilerine karşı antibakteriyel ve antibiyofilm etkileri ve Caco-2 insan kolon kanseri ve THP-1 insan monosit hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkileri araştırılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda kullanılan doğal bileşikler konsantrasyona bağlı olarak, bakterilerin ve hücre hatlarının proliferasyonunu azaltmıştır. Özellikle Caco-2 hücresinde gallik asitin IC₅₀ konsantrasyonunun 50 µM olduğu belirlenmiştir. *E. coli* normal bağırsak florasının baskın türü olduğundan dolayı *in vitro* ko kültür modelinde inflamasyon oluşturmak için *E. coli* LPS kullanılmıştır. THP-1 monosit hücreleri, *E. coli* LPS ile uyarılarak inflamasyon oluşturulmuştur. THP-1 ve Caco-2 hücreleri kullanılarak oluşturulmuş *in vitro* ko kültür modelinde, 50 µM gallik asitin pro/anti-inflamatuar sitokinleri açısından immünolojik etkileri değerlendirilmiş, TNF-α ve IL-1β seviyelerinde inhibisyon olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda gallik asitin *in vivo* olarak sıçanlar üzerinde çalışılan ülseratif kolit modelinde etkileri araştırılmış ve patogeneze oluşumunu azaltmada önemli bir rol oynadığı görülmüştür.

Gallik asit, antimikrobiyal, antibiyofilm aktiviteye sahip, *in vitro* ko kültür modelinde ve *in vivo* ülseratif kolit modelinde antiinflamatuar etki gösteren önemli bir doğal bileşiktir.

Anahtar Sözcükler: Biyofilm, Doğal bileşik, Caco-2, THP-1

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME NATURAL COMPOUNDS ON THE FORMATION OF BIOFILM ON INTESTINAL CELLS

Songül GÖNEL

Department of Pharmaceutical Microbiology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, December 2019

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK

Planktonic and biofilm forms of microorganisms; it consists of a potential threat in areas such as food, health, agriculture and industry. Biofilm formation occurs changing from planktonic forms of microorganisms to biofilm forms. In recent years, problems related to biofilm formation gradually have been increasing. Biofilm-related infections caused by opportunistic pathogens frequently occur, especially in immunocompromised individuals.

In this thesis, antibacterial and antibiofilm effects of gallic acid, resveratrol and curcumin against *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* and *E. coli* bacteria were investigated. The antiproliferative effects of these compounds in Caco-2 human colon cancer and THP-1 human monocyte cell lines were also investigated. As a result of these studies, natural compounds used decreased the proliferation of bacteria and cell lines depending on the concentration. Particularly in the Caco-2 cell, the IC₅₀ concentration of gallic acid was determined to be 50 µM. *E. coli* LPS was used to compose inflammation in the in vitro co-culture model since *E. coli* is the predominant species of normal intestinal flora. THP-1 monocyte cells were constituted inflammation by having stimulated with *E. coli* LPS. In in vitro co-culture model by having use THP-1 and Caco-2 cells, immunological effects of 50 µM gallic acid in terms of pro/anti-inflammatory cytokines were evaluated and inhibition of TNF-α and IL-1β levels was observed. At the same time, the effects of gallic acid in ulcerative colitis model studied in rats as in vivo were investigated and it was observed that gallic acid plays an important role in reducing the formation of pathogenesis.

Gallic acid is an important natural compound with antimicrobial, antimicrobial activity, showing anti-inflammatory effect in the in vitro co-culture model and in vivo ulcerative colitis model.

Keywords: Biofilm, Natural compound, Caco-2, THP-1

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamdaki süreç boyunca her konuda bilgi ve tecrübelerinin yanı sıra desteğini aldığım danışman hocam Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK'e;

Gerekli yardımlarıyla Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı hocalarım ve arkadaşlarımdan başta Arş. Gör. Mustafa Güçlü ÖZARDA'ya, Nalan BİRİZ'e, P. Ezgi TUNCER'e, Fatma GÜNDOĞAN'a ve son zamanlarda bilgisinin yanı sıra maddi manevi desteğini aldığım Pervin SOYER'e;

Tez çalışmalarım ile ilgili bilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Prof. Dr. Miriş DİKMEN'e, Arş. Gör. Elif KAYA TİLKİ'ye, Dr. Selin ENGÜR'e, Gökhan GÖKHANER'e;

Tez çalışmamın *in vivo* kısmına yardımcı olan Taras Shevchenko Ulusal Kiev Üniversitesi'ndeki Doç Dr. Ganna TOLSTANOVA ve çalışma arkadaşlarına;

Her zaman yanımda olan, maddi ve manevi yardımını aldığım, bilgisini benden hiçbir zaman esirgemeyen çocukluk arkadaşım Mete ÖZKOÇ ve diğer arkadaşlarıma;

Mesafelere rağmen beni sabırla bekledikleri için, her türlü fikir ve kararlarımda yanımda oldukları için, destekleriyle güç aldığım için, hayatımın huzuru, neşesi ve iyikleri oldukları için canım AİLEM'e;

Sonsuz teşekkür ederim...

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Songül GÖNEL

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

Songül GÖNEL

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
FINAL APPROVAL FOR THESIS	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
GÖRSELLER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Mikroorganizmalar ve Önemi	3
2.2. Biyofilm Oluşumunun Keşfi.....	3
2.3. Biyofilm Tanımları.....	4
2.4. Biyofilm Yapısı ve EPS (Ekzopolisakkarit)	5
2.5. Biyofilm Oluşum Mekanizması.....	6
2.5.1. Dönüşümlü tutunma	7
2.5.2. Geri dönüşümsüz tutunma	7
2.5.3. Koloni gelişimi	8
2.5.4. Biyofilmin olgunlaşması	8
2.5.5. Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması	8
2.6. Sinyal Molekülüyle İletişim (Quorum Sensing) (QS)	8
2.7. Biyofilm Oluşturan Bakteriler	11
2.7.1. <i>Escherichia coli</i>	11

2.7.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
2.7.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.7.4. <i>Enterococcus faecalis</i>	12
2.8. Biyofilm Dirençliliği	12
2.9. Bağırsak Mikrobiyotası	13
2.10. Biyofilm-Bağırsak Mikrobiyota İlişkisi	14
2.11. İBH Patogenezine İlişkin Bağışıklık Yanıtı ve Sitokinler	16
2.12. Doğal Bileşikler	18
2.12.1. Polifenoller	18
2.12.1.1. <i>Flavonoidler</i>	19
2.12.1.1.1. <i>Kurkumin</i>	20
2.12.1.2. <i>Lignanlar</i>	21
2.12.1.3. <i>Stilbenler</i>	21
2.12.1.3.1. <i>Resveratrol</i>	21
2.12.1.4. <i>Fenolik asitler</i>	21
2.12.1.4.1. <i>Gallik asit</i>	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
3.1. Mikrobiyolojik Çalışmalar	24
3.1.1. Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılanlar	24
3.1.1.1. <i>Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan cihazlar</i>	24
3.1.1.2. <i>Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler</i>	24
3.1.1.3. <i>Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve kullanılan besiyerleri</i>	24
3.1.1.3.1. <i>%0,25 Glikoz eklenmiş TSB (Tryptik Soy Broth)</i> ..	25
3.1.1.3.2. <i>MHB (Mueller Hinton Broth) ve MHA (Mueller Hinton Agar)</i>	25
3.1.1.3.3. <i>Fizyolojik tuzlu su (SF)</i>	25
3.1.1.4. <i>Standart bakteri suşları</i>	25
3.1.2. Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan yöntemler	26
3.1.2.1. <i>Gram boyama</i>	26
3.1.2.2. <i>Kullanılan polifenol bileşiklerin ve kontrol antibiyotiğin hazırlanması</i>	26

3.1.2.3. <i>Mikrobroth Dilüsyon Tekniği ile Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi</i>	27
3.1.2.3.1. <i>Resazürin ile MİK belirlenmesi</i>	28
3.1.2.4. <i>Biyofilm oluşturma</i>	28
3.1.2.5. <i>Antibiyofilm aktivitesi</i>	29
3.1.2.5.1. <i>Resazurinle belirlenen MBEK aktivitesi</i>	29
3.1.2.5.2. <i>SYTO-9/PI ile belirlenen antibiyofilm aktivitesi ..</i>	29
3.2. <i>İn-vitro Hücre Kültürü Çalışmaları</i>	30
3.2.1. <i>Hücre kültürü çalışmasında kullanılanlar</i>	30
3.2.1.1. <i>Hücre kültüründe kullanılan cihazlar</i>	30
3.2.1.2. <i>Kullanılan sarf malzemeler</i>	30
3.2.1.3. <i>Kullanılan kimyasal maddeler</i>	31
3.2.2. <i>Hücre kültürü çalışmasında kullanılan yöntemler</i>	31
3.2.2.1. <i>Çalışmada kullanılan Hücre Hatları</i>	31
3.2.2.2. <i>Kullanılan polifenol ve kimyasal bileşiklerin hazırlanması</i>	31
3.2.2.3. <i>Caco-2 veTHP-1 hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlık</i>	32
3.2.2.4. <i>Hücre sayımları</i>	32
3.2.2.5. <i>MTT ve WST-1 yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi</i>	33
3.2.2.6. <i>Sitotoksite yöntemlerinin uygulanması</i>	33
3.2.2.7. <i>Ko kültür hücre kültürü modeli ile akış sitometride örneklerin sitokin seviyelerinin belirlenmesi</i>	35
3.2.2.7.1. <i>Yöntemin uygulanması</i>	35
3.2.2.8. <i>Sitotoksite yöntemlerinin istatistiksel analizi</i>	36
3.3. <i>İn-Vivo Çalışmalar</i>	36
3.3.1. <i>Deney hayvanları</i>	36
3.3.2. <i>İn vivo deney tasarımı</i>	37
3.3.3. <i>İyodo-asetamid (İA) ile indüklenen kolonik inflamasyon modeli</i>	38
3.3.5. <i>Kolit başlangıcının klinik ve makroskopik olarak değerlendirilmesi</i>	38
3.3.6. <i>Vasküler geçirgenliğin In vivo ölçümü</i>	38
3.3.7. <i>Mukus glikoproteinlerinin periyodik asit/Schiff boyama ile araştırılması</i>	39
3.3.8. <i>Kolonda miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin incelenmesi</i>	40

3.3.9. <i>İn vivo</i> deneyin istatistiksel analizi	41
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	42
4.1. Mikrobiyolojik Çalışmalar	42
4.1.1. MİK sonuçlarının değerlendirilmesi	42
4.1.1.1. <i>Resazürin boyasıyla belirlenen MİK sonuçlarının değerlendirilmesi</i>	42
4.1.1.2. <i>SYTO-9/PI ile belirlenen canlı ve ölü hücrelerin değerlendirilmesi</i>	46
4.1.2. Biyofilm oluşum sonuçlarının değerlendirilmesi	50
4.1.3. Antibiyofilm sonuçlarının değerlendirilmesi.....	51
4.1.3.1. <i>MBEK yöntemiyle antibiyofilm etkinliğinin değerlendirilmesi</i> .	52
4.1.3.2. <i>SYTO-9/PI ile belirlenen biyofilmde canlı ve ölü hücrelerin değerlendirilmesi</i>	54
4.2. <i>İn Vitro</i> Hücre Kültürü Sonuçları	58
4.2.1. Polifenol bileşiklerin THP-1 Hücresindeki sitotoksik etkilerinin WST-1 yöntemi ile değerlendirilmesi.....	58
4.2.2. Polifenol bileşiklerin Caco-2 hücresindeki sitotoksik etkilerinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi.....	61
4.2.3. Ko-kültür hücre kültürü modeli ile akış sitometride örneklerin sitokin seviyelerinin değerlendirilmesi.....	64
4.3. <i>İn vivo</i> Çalışmaların Sonuçları.....	67
4.3.1. Gallik asidin sıçanlarda İA ile indüklenmiş ülseratif kolit üzerine etkisi	67
4.3.2. İA ile indüklenen kolitli sıçanlarda gallik asidin çekum üzerine etkisinin değerlendirilmesi	71
4.3.3. İA ile indüklenen kolitli sıçanlarda gallik asidin vasküler geçirgenliğe etkisi.....	73
4.3.4. Mukus glikoproteinlerinin periyodik asit/Schiff boyama ile değerlendirilmesi.....	75
4.3.5. İA ile indüklenen kolitli sıçanlarda gallik asitin MPO aktivitesi üzerine etkisinin değerlendirilmesi	76
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	78

KAYNAKÇA.....	80
----------------------	-----------

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. İnflamasyona bağlı bağırsak hastalığı (İBH) sırasında biyofilm oluşumunda rol oynayan mikroorganizmalar	16
Çizelge 2.2. Polifenol sınıflandırılması.....	19
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri ve suşları	25
Çizelge 3.2. Deney grupları ve hayvan sayıları	37
Çizelge 3.3. Deney tasarımının tablo şeklinde gösterimi.....	37
Çizelge 4.1. Polifenollerin ve pozitif kontrolün MİK değerleri.....	44
Çizelge 4.2. Polifenollerin bakteriler üzerindeki etkisinin, canlı ve ölü hücre olarak akış sitometride değerlendirilmesi.....	48
Çizelge 4.3. Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi	51
Çizelge 4.4. Polifenollerin bakteriler üzerindeki antibiyofilm etkileri	53
Çizelge 4.5. Polifenollerin biyofilm üzerindeki etkisinin, canlı ve ölü hücre olarak akış sitometride değerlendirilmesi.....	56
Çizelge 4.6. THP-1 hücrelerinin IC ₅₀ konsantrasyonları	60
Çizelge 4.7. Caco-2 hücrelerinin IC ₅₀ konsantrasyonları.....	63
Çizelge 4.8. Gallik asitin sitokin sonuçlarının çizelgede gösterilmesi.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Bakterilerdeki iletişim mekanizmaları	10
Şekil 2.2. Bağırsak mikrobityotasındaki bakteri sayılarının, organ çeşitliliğine göre artmasını gösteren şematik şekli.....	14
Şekil 2.3. Fenol yapısı	18
Şekil 2.4. Flavonoid yapısı.....	19
Şekil 2.5. Kurkuminin kimyasal yapısı	20
Şekil 2.6. Resveratrol kimyasal yapısı	21
Şekil 2.7. Gallik asit kimyasal yapısı	22
Şekil 3.1. Kloramfenikol molekül yapısı	27
Şekil 3.2. Mesalazin kimyasal yapısı	32
Şekil 4.1. Polifenollerin <i>E. coli</i> üzerindeki etkisinin, canlı ve ölü hücre olarak akış sitometride değerlendirilmesi.....	47
Şekil 4.2. Polifenollerin <i>E. coli</i> biyofilmi üzerindeki etkisinin, canlı ve ölü hücre olarak akış sitometride değerlendirilmesi.....	55
Şekil 4.3. Polifenol ve mesalazinin (pozitif kontrol) konsantrasyonlarının, THP-1 hücreleri üzerindeki % hücre canlılık değerleri.....	59
Şekil 4.4. Polifenol ve mesalazinin (pozitif kontrol) konsantrasyonlarının, Caco-2 hücreleri üzerindeki % hücre canlılık değerleri	62
Şekil 4.5. Gallik asitin ko kültür modelinde sitokin seviyelerinin akış sitometride ölçülmesi.....	64

Şekil 4.6. İA kaynaklı kolit ile sıçanlarda farklı dozlarda gallik asit uygulamasından sonra 1., 3., 5., ve 7. gündeki vücut ağırlıklarının değişimi	68
Şekil 4.7. İA kaynaklı kolit modeli ve sıçanlarda gallik asit uygulamasından sonra kolonik mukozada doza bağlı olarak değişen makroskopik sonuçlar.....	70
Şekil 4.8. İA kaynaklı kolitli sıçanlarda gallik asit uygulamasından sonra çekumun yaş ağırlığının doza bağlı değişimleri.....	72
Şekil 4.9. İA kaynaklı kolitli sıçanlarda gallik asit uygulamasından sonra kolonun permeabilitesinin belirlenmesi.....	74
Şekil 4.10. İA kaynaklı kolitli sıçanlarda gallik asit uygulamasından sonra kolonik mukozadaki glikoproteinlerin mukus seviyesinin kantitatif ölçümleri.....	75
Şekil 4.11. İA kaynaklı kolitli sıçanlarda gallik asit uygulamasından sonra kolonda MPO aktivitesi.	77

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 2.1. Biyofilm yapısı.....	5
Görsel 2.2. Biyofilm oluşumu ve yayılması	7
Görsel 2.3. QS iletişiminin temsili görseli.....	11
Görsel 2.4. Bazı Gr (+) ve Gr (-) bakterilerin mikroskop görüntüleri	12
Görsel 2.5. Bağırsak mikrobiyotası	13
Görsel 3.1. a) PVDF membranının Schiff reaktifinin içinde çalkalama sırasında görüntüsü; b)Tüm işlemlerden sonra PVDF membranının görüntüsü	40
Görsel 4.1. Kloramfenikolün dört bakteri üzerindeki MİK değerlerinin makroskopik görüntüleri	42
Görsel 4.2. Gallik asitin dört bakteri üzerindeki MİK değerlerinin makroskopik görüntüleri	43
Görsel 4.3. Kurkuminin dört bakteri üzerindeki MİK değerlerinin makroskopik görüntüleri	43
Görsel 4.4. Resveratrolun dört bakteri üzerindeki MİK değerlerinin makroskopik görüntüleri	44
Görsel 4.5. Antibiyofilm sonuçlarının makroskopik görüntüleri	52
Görsel 4.6. Gallik asitin THP-1 hücreleri üzerindeki belirli konsantrasyonlardaki mikroskop görüntüleri	58
Görsel 4.7. Gallik asitin Caco-2 hücreleri üzerindeki belirli konsantrasyonlardaki mikroskop görüntüleri	61
Görsel 4.8. Yaş kolonların kolit oluşturup oluşturmadığının makroskopik görüntüleri	69

Görsel 4.9. PVDF membranındaki Schiff reaksiyonu ile glikoproteinlerin makroskopik görüntüsü	75
---	----

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AI	: Oto-İndükleyici
α	: Alfa
ANOVA	: Varyans Analizi
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
5-ASA	: 5-Aminosalisilik asit
β	: Beta
BLPs	: Çin yaban mersini yaprakları
CFU	: Koloni oluşturan birim
ChC	: Kurkumin ve bal karışımı
CHQA	: <i>Cedrus deodara</i> , 3-p-trans-coumaroyl-2-hidroksikuinik asit
CLSI	: Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DSS	: Dekstran sodyum sülfat
EGCG	: Epigallokateşin-3-gallat
EGCG-S	: Epigallokateşin Gallat-Stearat
EPS	: Ekzopolisakarit, hücre dışı polimerik substrat
EM	: Evans Mavisi
FBS	: Fötal Sığır Serum (fötal bovine serum)
FCM	: Akış Sitometri
GA	: Gallik asit
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
HEGL	: <i>Ganoderma lucidum</i> 'un hidro-etanolik ekstresi
IC ₅₀	: İnhibitör Konsantrasyon (hücrelerin %50'sinin öldüğü)
IL	: İnterlökin
İA	: İyodoasetamid
İBH	: İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları
İp	: İntra peritoneal
KLSM	: Konfokal lazer tarama mikroskobu
KRC	: Kolorektal Kanser

LPS	: Lipopolisakkarit
MBEK	: Minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MPO	: Miyeloperoksidaz
MS	: Metilselüloz
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
n	: Tekrar sayısı ve hayvan sayısı
NDM-1	: New Delhi metallo- β -laktamaz
O _D	: Optik dansite
PGG	: 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glikoz
PBS	: Fosfat tuz tampon çözeltisi
PI	: Propidyum İyodid
PVDF	: Polyvinylidene difluoride
RSMA	: <i>S. miltiorrhiza f. alba</i> (Lamiaceae) köklerinden elde edilen e.
QS	: Quorum Sensing, (Sinyal Molekülüyle İletişim)
sn	: Saniye
SF	: Serum Fizyolojik Tuzlu Su
TNBS	: 2,4,6-Trinitrobenzen sülfonik asit
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TSB	: Triptik Soy Broth
UC	: Ülseratif Kolit

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Modern teknolojilerin ilerlemesine rağmen günlük hayatımızda biyolojik kirlenmeden dolayı bir takım problemler ortaya çıkmaktadır. Gıda, sağlık, tarım ve endüstri gibi alanlarda mikroorganizmaların planktonik formlarının ve biyofilm formlarının önemli rol oynadığı bilinmektedir. Planktonikten biyofilm büyüme moduna geçen bu adaptasyon, yakın olmayan bir ortamda yaşayan mikroorganizmalar için ortak bir hayatta kalma stratejisi içermektedir (Costerton vd., 1999). Biyofilm oluşumu, neredeyse tüm yüzeyler için potansiyel bir tehdit oluşturmakta ve büyük bir endişe kaynağı olmaktadır (Garret vd., 2008).

Biyofilmdeki EPS (Ekzopolisakkarit) tabakası, biyofilm içine belirli antimikrobiyal maddelerin girişini engellemektedir (Davey ve O'toole, 2000). Biyofilm oluşumunun kontrolünde ve engellenmesinde, tercih edilecek antimikrobiyal maddelerin, Quorum Sensing (QS, Sinyal molekülü ile iletişim) biyofilm oluşumunu engelleyici özellikte olması gerekmektedir. Ancak tercih edilen maddelerin, canlı doku içinde toksik olmaması tercih edilmelidir. Yeni antimikrobiyal ajanlar geliştirilirken, biyofilm mekanizması gözönünde bulundurulmalı ve bakterilerin karakteristik özellikleri dikkate alınmalıdır (Lebeaux, Ghigo ve Beloin, 2014). Bu nedenle biyofilm gelişimine etkili antimikrobiyal etkili ajanları saptamak için, standart tarama yöntemleri gerekmektedir. Ancak, halen yeni antibiyofilm ajanların değerlendirilmesi için altın standart yöntemler yoktur (Cruz, Shah ve Tammela, 2018). Literatürde, bitkilerin büyük bir bölümünden elde edilmiş ikincil metabolitleri için birçok antimikrobiyal aktivite sonucu bulunmaktadır. Bitkilerin ikincil metabolitleri arasında olan, flavonoidler, fenolik asitler ve tanenler gibi birçok polifenollün, antibakteriyel ve antibiyofilm etkisi literatürde gösterilmiştir (Slobodnikovo vd., 2016).

Özellikle bağıışıklığı bozulmuş kişilerde, fırsatçı patojenlerin oluşturduğu biyofilm kökenli enfeksiyonlar sıklıkla görülmektedir. Hem insan mikrobiyom bakterileri hem de patojenler, tıbbi cihazları, dişleri ve mukozal membranı kapsayan çeşitli yüzeylerde biyofilmler oluşturabilmektedir. Kronik bakteriyel enfeksiyonların %80'inden fazlası biyofilmle ilgilidir (Costerton vd., 1999).

Tez çalışması kapsamında; gallik asit, resveratrol ve kurkumin gibi bazı doğal bileşiklerin, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Enterococcus faecalis* bakterileri üzerinde antibakteriyel ve antibiyofilm etkinliği araştırılmış, Caco-2 insan kolon kanseri ve THP-1 insan monositik hücre hatları

zerinde antiproliferatif etkileri incelenmiştir. Bu alışmalar sonucunda gallik asitin *in vitro* ko kültür modelinde pro/antiinmflamatuvar sitokinler açısından değerlendirilerek immünolojik etkileri araştırılmıştır. Ayrıca *in vivo yapılan* araştırmada, patogenezi oluşumunu önlemek için kullanılan gallik asitin kolit üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Yapılan çalışmada, gallik asitin, *in vivo* lseratif kolit oluşturulmuş sıçanlarda miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesine, vasküler geçirgenliğine ve ülseratif kolit üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Mikroorganizmalar ve Önemi

Mikroorganizmalar (bakteri, virüs, alg, mantar ve protozoa), tüm yaşamın var olması üzerine, tüm ekosistemlerin temelidir (Maier, Pepper ve Gerba, 2000). Bakteriler; çok küçük, nispeten basit ve tek hücreli organizmalardır ve genetik materyalleri nükleer bir zar içermemektedir. Bu hücresel organizasyona dayanan bakteriler, prokaryotlar olarak sınıflandırılmakta ve öbakteriler ve arkeleri içermektedir. Bakteriler, her yerde bulunan organizmalardır ve en zorlu ortamlarda bile yaşayabilmektedirler. Çünkü bakteriler, hızlı büyüme, metabolizma ve tekrar üreme kapasitelerinin bulunmasına ek olarak, organik ve inorganik maddelerin farklı aralıklarını, karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma kabiliyetine sahiptirler (Pepper, Rensing ve Gerba, 2004). Bakteriler, nemli yüzeylerde daha yaygın olarak bulunmaktadır. Aynı zamanda, kaygan ve mukuslu bir yapı oluşturmak için katı yüzeylere yapışma özelliğine sahiptirler (Watnick ve Kolter, 2000).

Bakterilerin evrimi, adaptasyonu ve ekolojisi iç içe geçmiş mekanizmalardır. Bakterilerin biyolojisi anlaşılmaya çalışıldığında bu mekanizmanın nasıl çalıştığını ve birbiriyle nasıl ilişki kurduğunu ortaya çıkarmak, oldukça zor ve karmaşıktır. Son yıllarda hem yatay gen transferi hem de biyofilm, tıbbi mikrobiyolojinin yanı sıra çevresel mikrobiyolojinin araştırma alanları arasına girmiş ve bu da bakteriyel adaptasyon ve evrim konusundaki yüksek uygunluğun tanınmasına yol açmıştır (Madsen vd., 2012).

Bilimsel olarak kanıtlanmış bazı mikroorganizma türleri, insanları hem hasta etmekte hem de öldürebilmektedir (Fija, 2014). İnsan vücudunda yaşayan ve faydalı olan, önemli bir biyolojik mikroorganizma sistemi vardır. Bu biyolojik sistem insan mikrobiyomudur. Bir süredir insan vücudunun, vücuttaki insan hücrelerinin sayısından en az 10 kat daha fazla bakteri ile yaşadığı ve bu bakterilerin büyük bölümünün insan sindirim sisteminde var olduğu bilinmektedir (Savage, 1977; NIH HMP Working group, 2009).

2.2. Biyofilm Oluşumunun Keşfi

Mikrobiyologlar, 150 yıldan fazla bir süredir ekosistemlerde gelişen mikroorganizmaların doğal popülasyonlarının farklı yüzeylerde gelişmesi incelemek için doğrudan yöntemler kullanmışlardır. Mikrobiyoloji tarihi boyunca,

mikrobiyologların çok küçük bir kısmı, doğrudan, mikroskop ile incelemeyi seçmiş olup diğerleri ise; bakterilerin bir yüzeye yapışıp biyofilm oluşumunu başlattıktan sonra ki farklı şekilde büyüdüğünü bulmuşlardır. 1964 yılında Ralph Mitchell ve Kevin Marshall, saf kültürlerde bakteriler tarafından biyofilm oluşumunun ilk aşamalarını incelemişler ve bakterilerin yüzeylere geri dönüşümlü tutunması ile sonra gelen biyofilm oluşumunun ilk aşamasını oluşturan geri dönüşümsüz bağlanma arasında ayırım yapmışlardır. Planktonik bir bakteri hücresi keşfedilmiş bir yüzeyi algıladıktan sonra, aktif yapışma ve biyofilm oluşumu sürecine katılabilmektedir. Biyofilm keşifleri aslında biyofilmin basit yapısal biriminin mikro koloniler olduğunu göstermiştir (Costerton, 1999). Bakteriyel biyofilmlerin, doğada genellikle nemli yüzeylerde yaygın olduğu ve çevre sorunlarına neden olduğu gösterilmiştir (Costerton, Geesey ve Cheng, 1978).

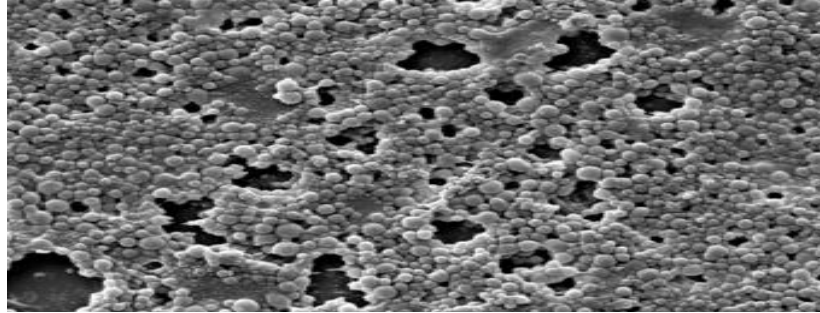
2.3. Biyofilm Tanımları

Biyofilm için bugüne kadar aynı sonuca varmakla birlikte birçok tanım yapılmıştır; bunlardan bazıları şöyledir; biyofilm katı yüzeylerde veya yüzeylerin gaz-sıvı ara yüzlerinde oluşan bakteri varlığının uzantısız biçimidir. Biyofilm, hücre içi polisakkaritler, proteinler ve hücre dışına salınan nükleik asitlerden oluşan ve bir biyofilm matriksi ile kaplanan mikroorganizma topluluğudur (Donlan ve Costerton, 2002). Bakteriler doğada planktonik bir formda veya biyofilm şeklinde bulunabilmektedir. Biyofilm, polisakkaritler, proteinler ve hücre dışı DNA'nın kendiliğinden üretilen polimerik matriksinde saklanmış yapısal bir mikroorganizma topluluğudur (Marcinkiewicz, Strus ve Pasich, 2013). Benzer bir tanımlamaya göre de bakteriyel biyofilmler cansız veya canlı bir yüzeye yapışabilmekte veya serbest topluluklar halinde var olabilmektedir (Madsen vd., 2012). Biyofilmler, mikroorganizmaların ve mikroorganizmalara bağlı hücre dışı ürünlerin bir ara yüzde toplandığı ve genellikle bir abiyotik veya biyotik yüzeye bağlandığını geniş bir şekilde tanımlanmaktadır. Biyofilmi oluşturan mikro koloniler, oluştukları çevresel değişkenlere bağlı olarak tek tür popülasyonlardan farklı türleri içeren bakteri topluluklarına kadar oluşabilmektedir (Davey ve O'toole, 2000). Bakteriyel biyofilmler, farklı işlemlerin gerçekleştirilmesi için çevre ile işbirliği yapan tekli ve çoklu tür iletişimleri oluşturan ve kendi oluşumunu düzenleyen bakteriler topluluğudur (Hall-Stoodley, Costerton ve Stoodley, 2004).

2.4. Biyofilm Yapısı ve EPS (Ekzopolisakkarit)

Biyofilm matriks yapısı ve bileşimi hakkında doğrudan bilgi oldukça sınırlıdır. Matriks, sudan ve hücrelerden salınan hücre dışı makro moleküllerden oluşmaktadır (Allison, 2003). Ayrıca, matriks yapısı ve bütünlüğü, makro ortamdaki değişikliklerden ağır bir şekilde etkilendiğinden ve biyofilm matriksini sürekli değiştirdiğinden, canlı bir ortam olarak kabul edilebilmektedir (Sutherland, 2001). Örneğin, matriks yapısının korunmasında ve matriksin içine gömülü hücrelerin ne kadar süredir EPS ürettikleri, hala bilinmemektedir. Ek olarak, Alison (2003), her bir matriksi kendine özgü mikroortamı ile farklı olarak düşünmenin doğru olacağını vurgulamaktadır.

Biyofilm matriksi; EPS (%1–2), litik ürünler ve salgılanan enzimlerin protein ve glikoproteinleri (%1–2), parçalanmış hücrelerden gelen nükleik asitler (%1–2) ve çevreyi saran lipid, fosfolipit ve iyonlardan oluşmaktadır (Goodwin ve Foster, 1989; Sand ve Gehrke, 1999; Flemming vd., 2000; Flemming ve Wingender, 2001). Biyofilm matriksinin ana bileşeni, %97 oranında sudur. Su, bakteri hücrelerinin kapsülleri içine bağlanabilmekte veya biyofilm içerisinde viskoziteyi arttırmak ya da birtakım maddelerin içinde çözünmesini sağlayan bir çözücü olarak kullanılmaktadır (Sutherland, 2001) (Görsel 2.1.).



Görsel 2.1. *Biyofilm yapısı (http-1)*

Bakteriyel topluluklar, hücre dışı polimerik substrat (EPS) tarafından desteklenen biyofilmleri oluşturmaktadır (Kim, Park ve Chung, 2012).

Biyofilmler metaforik olarak “mikroplar şehri” (Watnick ve Kolter, 2000) olarak adlandırılabilirse, EPS “biyofilm hücrelerinin evini” temsil etmektedir. EPS, gözenekliliği, yoğunluğu, su içeriği, yükü, emme özelliklerini, hidrofobik ve mekanik stabiliteyi etkileyerek bu mikro ortamda yaşayan biyofilm hücrelerinin yaşam koşullarının belirlenmesini sağlamaktadır. (Flemming ve Wingender, 2002).

EPS, biyofilmlerin hücre dışı polimerik maddeler olarak bilinmektedir. EPS, biyofilm içerisindeki popülasyona mimari yapı ve mekanik stabilite sağlayan, tüm biyofilmlerin karmaşık ve son derece önemli bir bileşenidir (Allison, 2003).

EPS, bakteriyel tutunmayı artırma, biyofilmin yapısal gelişimini teşvik etme, koruyucu bir bariyer sağlamanın yanı sıra biyofilm oluşumu için besin maddelerini emme ve depolama gibi birçok role sahiptir. Bu roller arasında EPS'nin koruyucu rolünün antibiyotiklere ve dezenfektanlara karşı biyofilm toleransını önemli ölçüde arttırdığı bildirilmektedir (Gilbert, Das ve Foley, 1997; Haas vd., 1998). EPS matriksi, biyofilmleri çevreleyen bileşiklerin difüzyonunu kısıtlayan bazı antimikrobiyal ajanların girişini önlemektedir. Biyofilmler, hücre popülasyonunun farklı çevresel streslerin üstesinden gelmelerini, plazmidlerin ve serbest Deoksiribo Nükleik asitin (DNA) değişimini ve hücreler arası iletişimi sağlamaktadır (Sifri, 2008). EPS, biyofilm mikroorganizmalarının gömülü olduğu mikrobiyal kökenli biyopolimerlerdir. Çevresel biyofilmlerde, polisakaritler genellikle sadece küçük bir bileşendir (Frolund vd., 1996). Spesifik olarak, EPS üretiminin aracılık ettiği biyofilm yapısı, biyofilmler ve akışkan ortamı arasındaki etkileşimi düzenlemektedir (Wingender, Neu ve Flemming, 1999). EPS, neredeyse tüm biyofilm matrikslerinde yaygındır. Ancak, miktar bakımından büyük bir bileşen olmasa da EPS, matriksin ana yapısal bileşeni olarak kabul edilmekte ve biyofilm kompleksi için bir sistem sağlamaktadır. Özünde EPS, mikrobiyal hücrelerin ve bunların biyoaktif ürünlerinin yerleştirildiği iskeleti sağlamaktadır (Allison, 2003). Ayrıca matriks antimikrobiyal toksinlere karşı bir zırh gibi davranmaktadır (Marcinkiewicz, Strus ve Pasich, 2013).

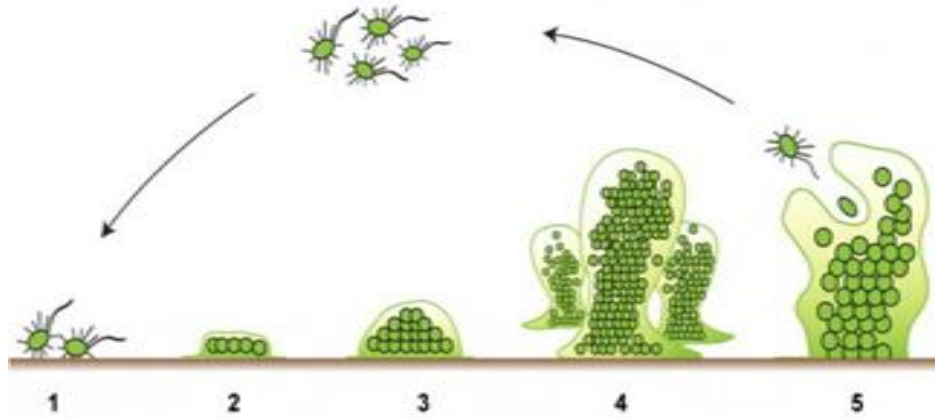
2.5. Biyofilm Oluşum Mekanizması

Biyofilm gelişimindeki en önemli aşama, biyofilmin oluşum mekanizmasıdır (Davey ve O'toole, 2000). Besin maddesi zengin olan besiyerinin, zayıf besiyerine kıyasla daha fazla biyofilm oluşturduğu için, biyofilm oluşumunu etkilemektedir (Hood ve Zottola, 1997). Bakteriyel biyofilm oluşumu hareketli bir süreçtir. Bu süreç planktonik bakterilerin yüzeye yapışmasıyla başlamaktadır, eğer koloniler yüzeyden ayrılmazsa bakteriler kalıcı bir şekilde ortamda kalabilmektedir. Daha sonra çoğalıp biyofilm matriksinin bileşeni olan EPS'yi üretmektedir. EPS'nin çeşitliliği bakteriyel sұşlara ve çevresel şartlara bağlıdır (Ghafoor ve Rehm, 2011; Meyle vd., 2010).

Biyofilm içindeki bakteriler, QS (Quorum Sensing) denilen olgu ile iletişim kurmaktadır. Biyofilm oluşumunu etkileyen bazı faktörler; besinlerin uygunluğu, yüzeye karşı kemotaksi, bakteri hareketliliği, yüzey adezinleri ve yüzey aktif cisimlerinin varlığı şeklinde sıralanabilmektedir (Thomas, 2007).

Yüzey bileşimi, morfoloji, yapı ve malzeme özellikleri dahil olmak üzere yüzey özellikleri, biyofilm hücrelerinin ilk tutunma aşamalarından başlayarak, ayrılmasının son aşamasına kadar biyofilm gelişimini etkilemektedir (Donlan, 2002).

Biyofilm oluşumunun döngüsü şu aşamalardan oluşmaktadır: dönüşümlü tutunma, geri dönüşümsüz tutunma, koloni gelişimi, olgunlaşma ve dağılma olmak üzere 5'e ayrılmaktadır (Görsel 2.2.) (McDougald, Rice ve Barraud, 2011).



Görsel 2.2. *Biyofilm oluşumu ve yayılması 5 aşamada gerçekleşir: 1. Dönüşümlü tutunma, 2. Geri dönüşümsüz tutunma, 3. Koloni gelişimi, 4. Biyofilm olgunlaşması, 5. Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması (http-2)*

2.5.1. Dönüşümlü tutunma

İlk adım, tek bir mikroorganizmanın zayıf, geri dönüşümlü Van Der Waals kuvvetleriyle (aynı moleküller arasındaki çekici veya itici güçlerin toplamı) bir substrata yapışmasıdır. Başlangıçta geçici olan bu tutunmayı ilerleyen adımlarda sağlam ve geri dönüşümsüz bağlanma takip etmektedir (Denkhaus vd., 2007).

2.5.2. Geri dönüşümsüz tutunma

Bu tutunmada, mikroorganizmalar hidrofobik ve hidrofilik gibi etkileşimleri sayesinde hücre organelleri ile yüzeye dönüşümsüz olarak bağlanmaktadır (Denkhaus vd., 2007).

2.5.3. Koloni gelişimi

Koloninin gelişimi aşaması; ilk koloni oluşumunu, EPS üretimi aracılığıyla kolaylaştırıp birarada tutarak bunların biyofilm içerisinde mikrokoloniler halinde toplanmasıdır (Denkhaus vd., 2007).

2.5.4. Biyofilmin olgunlaşması

Hücre bölünmesiyle hücre sayısındaki artış, olgun biyofilmlerle sonuçlanmaktadır. Biyofilm bileşimi ve yapısının yanı sıra maksimum biyokütle verimi, geniş bir şekilde hidrodinamik koşullara ve uygun besinlere bağlıdır (Denkhaus vd., 2007).

Olgun biyofilmdeki bakteriyel hücrelerin biyolojik özellikleri, aynı bakteri süşunun planktonik hücrelerinin özelliklerinden farklıdır. Önemli olan, bu kazanılmış özellikler, biyofilmde saklanmış bakterilerin özellikle uygun olmayan yerde hayatta kalmalarına izin vermektedir (Costerton vd., 1999; Drenkard, 2003).

2.5.5. Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması

Son aşama, hücrelerin çevresindeki ortamdan ayrılmasıyla karakterize edilmektedir (Denkhaus vd., 2007). Hücreler bu aşamada planktonik formlarına geri dönmektedir. Ayrılan planktonik hücreler yeni biyofilm topluluklarını oluşturabilmektedir. Bu süreç bir dengeye oturunca ise süreklileşmektedir (Henke ve Bassler, 2004).

2.6. Sinyal Molekülüyle İletişim (Quorum Sensing) (QS)

Biyofilm, plazmidlerin ve farklı çevresel streslerin üstesinden gelmelerini sağlayan serbest DNA alışverişini kolaylaştırmak için hücrelerin birbirine yakın yaşamalarını sağlama özelliğine sahiptir (Srivastava vd., 2017). Biyofilmdeki bakteriler, metabolizmalarını ve diğer karmaşık işlemleri koordine etmelerine yardımcı olan QS olarak bilinen kimyasal iletişimi kullanmaktadır (Sifri, 2008).

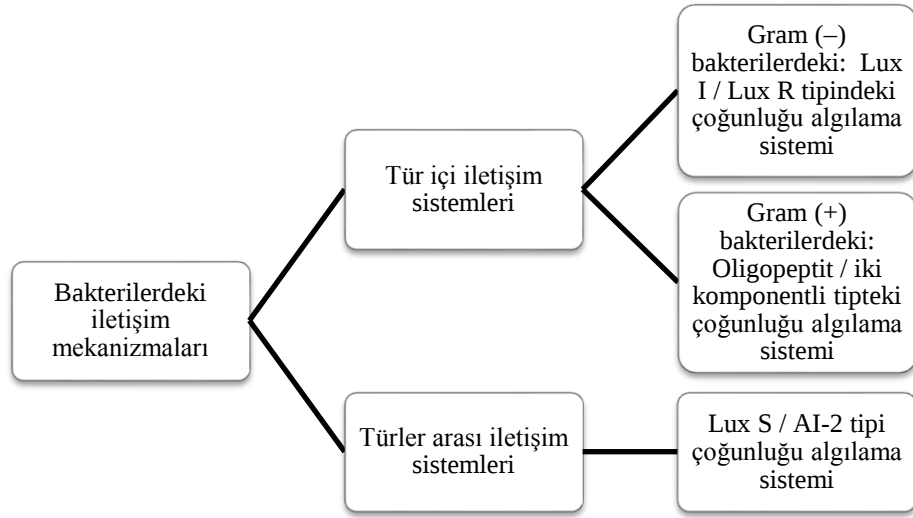
QS, bakterilerin hücre-hücre iletişimi, transkripsiyonel düzenlemeyi tetiklemek için iletişimi ve davranış koordinasyonu için en önemli mekanizmalardan biri olarak bilinmektedir (Camara, 2007). QS, hücre popülasyonunun yoğunluğundaki değişikliklere cevap olarak gen ifadesinin düzenlemektedir.

QS, üretilen kimyasal sinyallerin konsantrasyonuna ve bakteri üremesine bağlıdır (Winzer, Hardie ve Williams, 2002). Bakteriyel iletişim (QS), kimyasal sinyaller ile kontrol edilen, bakteriyel yapışmanın, biyofilm birikiminin ve bakteriyel dağılmanın mekanizmasında, yani kısaca biyofilm gelişim sürecinde çok önemli bir rol oynamaktadır (Rutherford ve Bassler, 2012).

QS, bakteri topluluklarının davranışsal aktivitelerinin yanı sıra metabolik olayları optimize etme özelliğine sahiptir. Bakterilerde, virülans faktör ifadesi, dinlenme fazının başlangıcı, biyoluminesans, antibiyotik üretimi gibi birçok işlem QS ile düzenlenmektedir. Gram (+) pozitif veya Gram (-) negatif bakteri olması durumunda QS mekanizma süreci farklı işlemektedir (Mukherjee vd., 2017).

Aynı türe veya farklı türe ait bakteriler arasındaki iletişim, bakteri tarafından sentezlenen ve salgılanan farklı kimyasal sinyaller aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu sinyaller ya hücre yoğunluğu ile ilgili değişmekte (oto indüktörler) ya da büyümenin farklı aşamalarında bakteri tarafından gerçekleştirilebilmektedir. Bu sinyaller, bakterilerin, bir rekabet avantajı elde etmelerine ve aynı zamanda onların çevresel değişikliklere yanıt verecek olan gen ifadelerini kontrol etmelerine izin vermektedir. Bu sinyallerin özellikleri ve onların ortaya çıkardığı tepki, yüzlerce bakteri türünün bir arada olduğu doğal ortamlarda, bakteri canlılığı ve çoğalmasını sağlamada çok önemlidir. Birincisi, tür içi iletişim ve QS'nin altında yatan bir sinyal ile o sinyalin alıcısı arasındaki etkileşim, çok spesifiktir. İkincisi, aynı bakteri tarafından birden fazla sinyal sentezlendiğinde, farklı sinyallerin oluşturduğu devreler koordineli bir şekilde düzenlenerek toplam tepkinin en üst düzeye çıkarılmasını sağlamaktadır. Üçüncüsü, farklı bakteri türleri (türler arası iletişim) ve ökaryotik hücreler tarafından sentezlenen evrensel iletişim sinyalleri, enfeksiyon ve hastalıklarda da önemli bir yere sahip olan biyofilm topluluklarının bir parçasıdır (Jayaraman ve Wood, 2008).

Bakterilerdeki iletişim mekanizmaları, tür içi ve türler arası olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.1.) (Karaboz ve Sukatar, 2004).

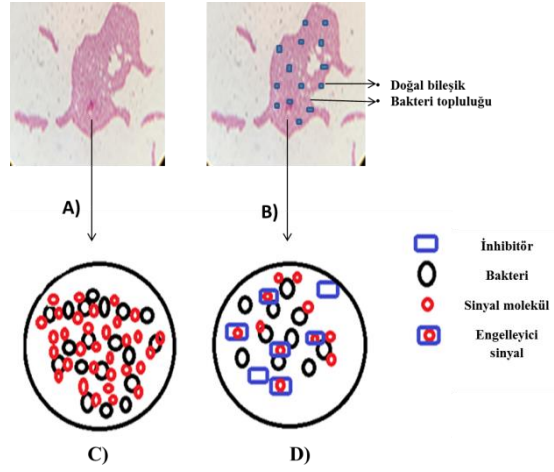


Şekil 2.1. *Bakterilerdeki iletişim mekanizmaları*

Birçok Gram (-) bakteri, sinyal bileşiği olarak N-açıl homoserin laktonları (AHL) kullanmaktadır. Sinyal molekülü, Lux I tipi sentaz tarafından sentezlenmektedir ve hedef genlerin ifadesini düzenlemek için bir konjuge Lux R tipi transkripsiyonel aktivatör proteinine bağlanmaktadır (Hentzer vd., 2002). Gram (+) bakterilerde ise AHL molekülleri bulunmamakta onun yerine otoindükleyici peptitler (AIP) bulunmaktadır (Hentzer vd., 2002). Bakterilerde meydana gelen türler arası iletişimden sorumlu otoindükleyici molekül AI-2'dir. AI-2 üretiminden sorumlu olan gen ise Lux S'dir (Federle ve Bassler, 2003).

Bakterilerde tür içi ve türler arası iletişime engel olan doğal ve sentetik inhibitörleri geliştirmek, bakteriyel hastalıklar için yeni tedavi şekilleri ortaya çıkarabilir (Federle ve Bassler, 2003). Kırmızı bir deniz algi olan *Delisea pulchra*'dan izole edilen halojenlenmiş furanonlar, Gram (-) bakterilerde QS'i engellediği bilinen ve inaktif hale getiren bir moleküldür. Ayrıca, vanilin, kateşin, kumarik asit ve sarımsak özütü gibi çeşitli doğal bileşiklerin, QS için doğal bir inhibitör olarak etki gösterdiği bilinmektedir (Xu vd, 2003; Bauer ve Robinson, 2002).

Doğal bileşiklerin QS ile iletişiminin temsili görseli Görsel 2.3.'de verilmiştir.



Görsel 2.3. QS iletişiminin temsili görseli, Bakterinin mikroskop görüntüsü (A), bakteri topluluğuna doğal bileşik verilmesinin temsili görseli (B), bakteri topluluğundaki, QS iletişiminin temsili görseli (C), doğal bileşiğin etkisiyle QS iletişimlerinin bakteri topluluğuna etkisinin temsili görseli (D).

2.7. Biyofilm Oluşturan Bakteriler

Hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriler biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptirler. Bu bakterilere örnek olarak; *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* ve *Pseudomonas aeruginosa* verilebilir (Donlan, 2001).

2.7.1. *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae familyasında bulunan *E. coli*, Gram (-), spor oluşturmeyen, fakültatif anaerob, kokobasil şeklinde bakterilerdir (Huang vd., 2016). *E. coli* 7- 45 °C sıcaklıklar arasında üreyebilmektedir (Erol, 2007). *E. coli* normal bağırsak florasının baskın aerobik türüdür ve aynı zamanda pek çok bakteriyel enfeksiyon oluşturan bakteriler arasındadır (Darfeuille Michaud vd., 1998). *E.coli*, bağırsaklarda üreyen enterik bakteriler grubunda yer almaktadır. *E. coli*, insanlar için önemli bir fırsatçı patojendir. En fazla çalışılan model organizma olan *E. coli*, bakteri biyolojisinin anlaşılması amacıyla birçok çalışma da kullanılmaktadır (Ustaçelebi 1999).

2.7.2. *Pseudomonas aeruginosa*

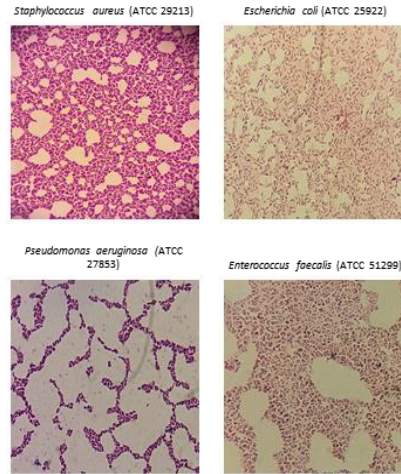
P. aeruginosa, Pseudomonadaceae ailesi içinde, Gram (-) basiller olup, spor oluşturmeyen en fırsatçı patojen türüdür. Sağlıklı bireylerde kolonize olarak yaşamaktadır (Bilgehan, 2000; Erdem, 1999).

2.7.3. *Staphylococcus aureus*

Micrococcaceae ailesinden olan üzüm salkımı şeklinde kümeler yapan küresel Gram (+) koklardır. *S. aureus* bakterisi spor oluşturmeyen, fakültatif anaerobdur (Bayhün, 2008). Çoğu izolatları 10-45 °C sıcaklıkları arasında yaşayabilmektedir. Optimum gelişme sıcaklığı ise 30-37 °C arasındadır (Erk vd., 1994).

2.7.4. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus cinsinin üyeleri, Gram (+), fakültatif, anaerob koklardır. İnsanların gastrointestinal sisteminin doğal florasında bulunan *E. faecalis* ve *E. faecium* en önemli iki türüdür (Karakaş, 2005). Bu bakterilerin bazılarının mikroskop görüntüleri Görsel 2.4.'de verilmiştir.



Görsel 2.4. Bazı Gr (+) ve Gr (-) bakterilerin mikroskop görüntüleri

2.8. Biyofilm Dirençliliği

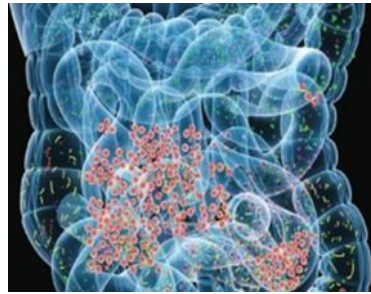
Biyofilme nüfuz eden besinlerin, metabolitlerin, oksijenin, pH'ın, redoks potansiyelinin veya antibiyotiklerin değişimleri, bakterilerde çevresel bir stres oluşturmakta ve indüklenebilir direnç mekanizmalarının, artan değişkenlik oranının ve bakteriyel adaptatif fenotip değişikliklerinin ifadesi ile sonuçlanmaktadır. Bu değişimler, bakterilerde metabolik baskıya neden olmaktadır (Hoiby vd., 2010; Maisonneuve ve Gerdes, 2014).

Planktonik bakteriler birçok antimikrobiyal maddeye karşı dirençliken, biyofilme bu direnç oldukça artmaktadır. Yapılan çalışmalar, karışık türlerden oluşan biyofilmlerin tek türden oluşan biyofilmlere göre daha dirençli olduğunu göstermektedir

(Lee vd., 2013). Kalıcı medikal cihazlar, kontakt lensler gibi canlı doku içeren çeşitli yüzeylerde de biyofilm oluşabilmektedir (Kokare vd., 2009). Bu yüksek direncin, antimikrobiyal ajanın bağlanmasını, inhibitörlerin etkisinin azalmasını, nütürleştirici enzimlerin lokalizasyonunu ve yüzey büyümesi nedeniyle dirençli bir fenotip ifadesini kapsayan, birçok faktörün birleştirilmiş etkisi ile indüklendiğine inanılmaktadır (Costerton vd., 1987). Biyofilmdeki, birçok ilaca karşı dirençli patojenik bakteriler, kliniksel olarak çevrede bir tehdit oluşturmaktadırlar. Sonuç olarak, biyofilm oluşumunu önlemek ve biyofilmdeki bakterilerin canlılığına etki eden antimikrobiyal ajanları bulmak için çeşitli çalışmalar, yürütülmektedir. Birçok çalışmada bitkilerden elde edilen doğal bileşiklerin, mikrobiyal biyofilm oluşumunu etkilediği gösterilmiştir (Rasooli vd., 2008; Koo vd., 2010; Song vd., 2007; Palombo, 2011; Shayegh ve Rasooli, 2008). Biyofilm, antibiyotik ve dezenfektanlara karşı artan bir direnç göstermektedir. Bazı antibiyotiklerin biyofilmdeki bakterilere etkin tedavi edici konsantrasyonu, planktonik bakterilere göre 100 ila 1000 kat daha yüksek olabilmektedir (Hoiby vd., 2011).

2.9. Bağırsak Mikrobiyotası

Gastrointestinal sistemin mikroflorası büyük ölçüde hem aerob hem de anaerob mikroorganizmalardan oluşan karışık bir ekosistemdir (Görsel 2.5.) (Gary, 1982).



Görsel 2.5. *Bağırsak mikrobiyotası* (<http-3>)

İnsan bağırsağının mikroplarla kolonizasyonu doğum anında hemen başlar (Redondo-Lopez, Cook ve Sobel, 1990) ve oluşumu, çocukluktan erişkinliğe ulaşana kadar değişmektedir (Vieira, Teixeira ve Martins, 2012). Konak ve bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişki simbiyotiktir. Kommensal bağırsak mikrobiyotası, enfeksiyonlara karşı direnç arttırmaya, konakçı bağışıklık sisteminin farklılaşmasına, vitaminler, kısa zincirli yağ asitleri ve diğer düşük molekül ağırlıklı moleküller gibi bazı

besin maddelerinin sentezine katkı sağlamaktadır (Ubeda ve Pamer, 2012; Fija, 2014). İnsan bağırsak mikrobiyotası, konakçıda ki genetik özellikler ve çevresel etkilerin bir sonucu olarak sağlıklı bireyler arasında önemli bir şekilde değişiklik göstermektedir (Abreu ve Peek, 2014).

2.10. Biyofilm-Bağırsak Mikrobiyota İlişkisi

Biyofilm enfeksiyonları kavramının tıptaki önemi 40 yıl kadar öncesine dayanmaktadır. Biyofilm teriminin tıp alanına girmesi 1985 yılında Costerton tarafından olmuştur ve 1985’li yıllarda, biyofilm enfeksiyonlarının tıpta yaygın olduğu ve bunların öneminin genel olarak kabul edildiği anlaşılmıştır. (Hoiby, 2014).

Mikrobiyotadaki değişiklikler ve insan hastalıkları arasındaki ilişkiler, bağırsak mikrobiyal sinyallerinin etkileşimini etkileyerek bağışıklık yanıtların şekillenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu sinyaller doğal bağışıklık hücreleri tarafından tanınmakta ve hücrelerin hem bölgesel hem de sistemik bağışıklık yanıtını düzenleyerek etkilemektedir (Abt ve Artis, 2009). Bağırsak mikrobiyotası homojen değildir ve bakteri hücrelerinin sayısı her bölgede değişmektedir. Bakteri sayıları ve çeşitliliği büyük bir şekilde mideden kalın bağırsağa doğru gidildikçe artmaktadır (Sekirov vd., 2010), (Şekil 2.6.). İnsan midesi ve bağırsağı aerobik ve anaerobik mikroorganizmaların oldukça karışık bir ekosisteminden oluşmaktadır. Mide mikrobiyotası aerobik bakterilerce düşük sayıda iken bağırsağın büyük bir kısmında doğal olarak anaerobik bakterilerin yüksek miktarları seyreder (Rubinstein, 1990).



Şekil 2.2. Bağırsak mikrobiyotasındaki bakteri sayılarının, organ çeşitliliğine göre artmasını gösteren şematik şekli (Sekirov vd., 2010)

Modern mikrobiyoloji, çeşitli kronik enfeksiyonların patogeneğinde ve tedavisinde mikrobiyal biyofilmlerin rolüne dair anlayışımızı değiştirmektedir (Costerton vd., 1999). Patojenler, bağırsak mikrobiyotasının bağlanma alanlarının işgal

edilmesine bağlı olarak besin kaynaklarının tüketiimi ve antimikrobiyal maddelerin üretiimi gibi bir takım süreçlere etki ederek konakçısına fiziksel bir engel sağlamaktadır. Aynı zamanda bağırsak mikrobiyotası, çeşitli antimikrobiyal bileşikler ürettiimi için konakçıyı uyarmaktadır (Sekirov vd., 2010).

Bağırsak mikrobiyotasının üyeleri arasındaki sinyal, bağırsak ekosisteminde dengenin kurulmasında ve korunmasında önemli rol oynamaktadır (Samuel ve Gordon, 2006).

İnsanlarda bağırsak ekosisteminin mikroflorası genellikle fakültatif anaerob (oksijenli ve oksijensiz ortamda yaşıayan) ve zorunlu anaeroblardan (oksijenli ortamda yaşıayamayan, oksijensiz ortamda yaşıayan) oluşmaktadır. Bu bakteriler, Bifidobacterium, Clostridium, Eubacterium, Fusobacterium, Peptococcus, Peptostreptococcus ve Bacteroides türlerinin içinde bulunduğu anaerobik bakterilerdir. Aynı zamanda Lactobacilli, Microcococcaceae ve Enterobacteriaceae ailesinin bazı türlerinin bulunduğu fakültatif aerobik bakteriler (aslında anaerob olup oksijen varlığında gelişebilen) de bulunmaktadır (Simon ve Gorbach, 1984).

Kronik iltihaplanma enfeksiyonlarını kapsayan birçok hastalıkta, bakterilerin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Raut, Pasini ve Daunert, 2013). İnflamasyona bağlı bağırsak hastalıkları (İBH, İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı), kolonun mukozal ve mukus zarının altındaki kısmını kapsayan ve idiyopatik (nedeni bilinmeyen) bir inflamatuvar hastalıktır. İnsanlarda ortaya çıkan İBH'lerin en önemli iki tanesi Crohn hastalığı (ağızdan anüse kadar herhangi bir yerde meydana gelen kronik bir hastalık) ve ülseratif kolittir (kolonun tekrarlayan inflamatuvar düzensizliği) (Hartmann vd., 2000; Klein, Stein ve Dressman, 2005). İBH sırasında biyofilm oluşumunda rol oynayan mikroorganizmalar, Çizelge 2.1.'deki gibidir.

Çizelge 2.1. İnflamasyona bağlı bağırsak hastalığı (İBH) sırasında biyofilm oluşumunda rol oynayan mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar	Referanslar
<i>Helicobacter pylori</i>	Cammarota vd., 2010; Carron vd., 2006; Cellini vd., 2008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Leibovitz vd., 2003
<i>Staphylococcus aureus</i>	Segal vd., 2006
<i>Escherichia coli</i>	Darfeuille Michaud vd., 1998
<i>Candida albicans</i>	Dautle, Wilkinson ve Gauder 2003
<i>Shigella spp.</i>	Onderdonk, Cisneros ve Bronson, 1983
<i>Enterobacteriaceae</i>	Le Moal, Fayol-Messaoudi ve Servin, 2013
<i>Campylobacter concisus</i>	Zhang vd., 2014
<i>Vibrio cholerae</i>	Zhang vd., 2014
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Jansen vd., 2016
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ammendolia vd., 2014

Bazı araştırmalar, akut inflamasyondan İBH ve hatta kolorektal kansere (KRC) dönüşümün aynı zamanda anormal molekülerin iletişimine neden olan değişmiş bakterilerin metabolitlerinin bir sonucu olduğunu göstermektedirler. Çoğu besinsel fenolikler, emiliminden önce bağırsak mikrobiyotası tarafından metabolitlere dönüştürülmektedir. Bu mikrobiyal dönüşüm, besinsel bileşiklerinin biyolojik aktivitesini belirlemek için kritik olabilmekte, çünkü daha aktif veya inaktif metabolitler verebilmektedir (Abreu ve Peek, 2014).

2.11. İBH Patogenezinin İlişkin Bağışıklık Yanıtı ve Sitokinler

İBH hastalıklarında dokuya zarar veren bağışıklık yanıtları, yerleşik bakteriyel floranın üyelerine karşı doğrudan ilgilidir (Dubos, 1966). Adaptif bağışıklık sisteminin İBH patogenezinde birincil rol oynadığına inanılmaktadır. Özellikle, geniş bir araştırma alanı, bu hastalığı teşvik edebilen patojenik CD4⁺ T lenfositlerin tanımlanmasına ve karakterizasyonuna odaklanmaktadır. Bu hücreler İBH'li hastalarda kronik bağırsak inflamasyon gelişimini karakterize eden bağırsak mukozasında, T hücrelerinin birikimini teşvik etmektedir (Cominelli, 2004). Yani, CD4⁺ T hücreleri, yardımcı T lenfositleri olup, B lenfositlerini antikor sentezlemek için uyarmaktadır. Bazı bakteriyel toksinlerin, çok sayıda CD4⁺ T lenfositlerini uyardıkları bilinmektedir (Abul, 1991).

Gram (-) bakterilerde lipopolisakkarit (LPS) adı verilen endotoksinler, bakterinin hücre duvarı bileşenleridir. Endotoksinler, doku hasarı gibi fizyopatolojik etkilere neden olmaktadır (Anspach, 2001; Ogikubo vd., 2004). Ayrıca interlökinler gibi büyümeyi teşvik edici faktörlerin sentezini ve salgılanmasını uyarmak için de kullanılmaktadır (Oppenheim, vd., 1986). Makrofajların, LPS molekülünün Lipid A bölümü tarafından indüklenen aktivasyonu, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-10 gibi sitokinlerin üretilmesine neden olmaktadır (Galanos ve Freudenberg, 1993).

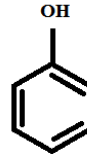
Sitokinler, bağışıklık sistemine katılan hücrelerin azalmasını ve artmasını sağlayan T ve B lenfositler, makrofajlar, monositler ve diğer bazı hücrelerce salınan hormona benzeyen moleküllerdir. Çeşitli hücrelerin yüzey reseptörlerine bağlanma özellikleri vardır. Bakteriyel enfeksiyonlardan dolayı kanda da bulunabilmektedir. Sitokinler, hem belli bir fonksiyonun aktivasyonunu hem de baskılanmasını etkileyebilmektedir. Bu fonksiyon, bağışıklık yanıtında ve doku hasarında hücreler arası iletişimi sağlamaktadır. Başlıca sitokinler; interlökinler (IL), interferonlar ve diğer sitokinlerdir. Bunlar arasında IL-1; monosit, makrofaj hücrelerden salgılandığı gibi tüm çekirdekli hücrelerden salınabilmektedir. B lenfositlerinin çoğalıp farklılaşmasını ve antikor oluşumunu sağlamaktadır. T lenfosit fonksiyonlarını uyarmaktadır. Endojen pirojen olup inflamasyon oluşumunda en önemli araçtır. IL-6; T ve B lenfositleri monosit ve epitel hücrelerince salgılanmaktadır. Aktive olmuş B lenfositlerini plazma hücrelerine çevirmektedir. IL-8; T lenfositleri ve nötrofil infiltrasyonunu (kemotaksis) sağlamaktadır. Bu infiltrasyonun etkisi, sitokinlerin etkisi ile oluşmaktadır. Yangıda, hasarlı doku IL-8, salgılamakta; makrofajlar IL-1, IL-6 ve TNF- α salgılamakta ve ödem oluşturmaktadır. IL-10; T lenfosit mast hücresi ve makrofajlardan salınmaktadır. Farklı hücrelerdeki sitokin sentezini önlemekte ve mast hücrelerinin çoğalmasını sağlamaktadır. TNF- α (tümör nekroz faktörü; aktive makrofaj, T ve B lenfositleri, fibroblast ve bazı hücrelerce oluşturulmaktadır (Tunalı, 2015).

İBH patogeneğinde rol oynayan birkaç sitokin ve molekül tanımlanmaktadır. TNF- α en önemli sitokinlerden biridir. TNF- α 'nın İBH'de inflamatuvar rolü ile ilgili olarak, inhibisyonu, terapötik bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Rahimi, Nikfar ve Abdollahi, 2007 a, b). Ayrıca, İBH patogeneindeki antiinflamatuvar (IL-10) ve proinflamatuvar (IL-1 β , IL-6 ve TNF- α) sitokinler arasındaki dengesizliklerin, inflamasyonunu değiştirmede merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (Ardizzone ve Porro, 2005; Slebioda ve Kmiec, 2014).

2.12. Doğal Bileşikler

2.12.1. Polifenoller

Polifenoller, beslenmeyle bol miktarda alınan, mikro besin maddeleridir ve meyvelerin, sebzelerin, kuru baklagillerin, çay, kahve veya şarap gibi içeceklerin yaygın bileşenleridir. Polifenol yapısına sahip çeşitli moleküller yenilebilir bitkilerde bulunmaktadır ve bu moleküller fenol halkalarının (Şekil 2.3.) sayısının fonksiyonuna bağlı olarak sınıflandırılmaktadır; flavonoidler, lignanlar, stilbenler ve fenolik asitler gibi. (Manach vd., 2004). Bu sınıflandırmaya ait örnekler ve gruplandırılmalar Çizelge 2.2.'de verilmiştir (D' Archivio vd., 2007).



Şekil 2.3. Fenol yapısı

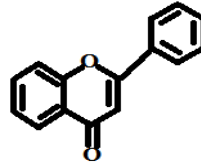
Polifenoller antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanserojenik gibi aktivitelere sahip olduğu için etkileri, insan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Böylece polifenoller, birincil kimyasal koruyucu ajanlar olarak tercih edilmektedir (Kang vd., 2011). Bitki polifenoller, bitkilerin biyolojik olarak aktif ikincil metabolitlerinin büyük bir sınıfını temsil etmektedir (Pereira vd., 2009). Bitki fenolikleri üzerindeki antibiyofilm aktivite araştırmaları, bakteriler üzerindeki yıkıcı aktivitelerinin olmasının yanı sıra, bir bakterinin üreme etkisi olmaksızın, QS ve düzenleyici sistemler gibi bakteriyel düzenleyici mekanizmalarını etkileyerek biyofilm baskısına neden olan daha hafif aktiviteleri de ortaya çıkarmaktadır (Silva vd., 2016).

Çizelge 2.2. Polifenol sınıflandırılması

Polifenoller			
Flavonoidler	Lignanlar/Fenolik alkol	Stilbenler	Fenolik Asitler
1. Flavonoller	-Tirosol/Çam reçine alkolü	-Resveratrol	1. Hidroksi benzoik asit
- Kuersetin	(fenolik alkol),	-Pikeatannol	-Gallik asit
2. Flavonlar	-Steganasin (lignan)		2. Hidroksi sinamik asit
- Apigenin			-Klorajenik asit
3. Flavanonlar			
- Naringenin			
4. İzoflavonlar			
- Genistein			
5. Flavanoller			
- Kateşin			
6. Antosiyaninler			
- Siyanidin			
7. Kalkonlar			
- Kurkumin			

2.12.1.1. Flavonoidler

En büyük polifenol grubunu içeren flavonoidler Şekil 2.4.'de görüldüğü gibi iki benzen halkasının, oksijen içeren bir piren halkasına bağlanmasıyla oluşmaktadır (Manach vd., 2004).



Şekil 2.4. Flavonoid yapısı

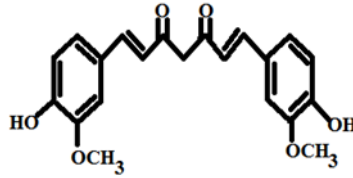
Flavonoid gruplarından oluşan flavonoller, elma, üzüm, siyah-yeşil çay, soğan, brokoli ve pırasa gibi bitkilerde; flavonlar, maydonoz, acı kırmızı biber ve kerevizde; flavanonlar, portakal, limon ve greyfurt suyunda; izoflavonlar, soya içerikli baklagillerde; flavanoller, yeşil çay, kayısı, üzüm, şeftali, elma, kiraz ve çikolatada;

antosiyantinler ise siyah kuş üzümü, siyah üzüm, yaban mersini, kiraz, çilek ve böğürtlen gibi meyvelerde bol miktarda bulunmaktadır. (Manach vd., 2013; Macheix, Fleuriet ve Billot, 1990).

Kalkonlar, polifenollerin flavonoid sınıfına ait ve önemli biyolojik aktiviteler gösteren organik bir bileşiktir. Genel olarak, kalkon veya kalkonoidler olarak bilinen önemli biyolojiklerin, çeşitliliği için, merkezi bölgeyi oluşturan aromatik bir keton ve bir ketona birleşen alkenden oluşan organik bir bileşiktir. Bu grubun doğal bileşikleri arasında kurkumin yer almaktadır (E. Aksöz ve Ertan, 2011; http-4).

2.12.1.1.1. *Kurkumin*

Kurkumin, zerdeçal köklerinde bulunan sarı renkli temel polifenolik bir pigmenttir (*Curcuma longa* L., Familya: Zingiberacea) (Karewicz vd., 2011). Kurkumin, C₂₁H₂₀O₆ kapalı formülüne sahip, 368,38 g/mol moleküler ağırlığına sahip, Şekil 2.5.'de görüldüğü gibi fenolik –OH grubu içeren polifenolik bir antioksidan bileşiktir (Aggarwal vd., 2007).



Şekil 2.5. Kurkuminin kimyasal yapısı

Hindistan'da zerdeçal, cilt bakımı için kozmetik bir ajan ve Ayurveda tıbbında (eski hindu hekimlik ve uzun yaşam sanatı) yaygın bir tür olarak kullanılmaktadır. Kurkumin (doğal ilaç), antioksidan, analjezik, antiinflamatuvar ve antiseptik aktiviteleri içeren tedavi edici özelliklerin çeşitliliğine sahip olduğundan ve toksik olmadığından dolayı, Ayurveda tıbbında yüzyıllardır kapsamlı olarak kullanılmaktadır (Zhou, Beevers ve Huanq, 2011). Son yıllarda, doğal bileşik kurkuminin, çoklu farmakolojik etkileri dikkat çekmektedir (Shen, 2012). Aynı zamanda kurkuminin antibakteriyel, yara iyileştirici, karaciğer koruyucu gibi aktivite gösterdiği bilinmektedir (Setthacheewakul, 2010).

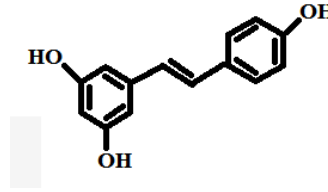
2.12.1.2. Lignanlar

Lignanlar, miktar açısından hububatlar, tahıllar, meyveler ve bazı sebzelere göre, keten tohumu gibi yağlı bitkilerde bol miktarda bulunmaktadır. (Adlercreutz ve Mazur, 1997).

2.12.1.3. Stilbenler

2.12.1.3.1. Resveratrol

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksitransstilben), $C_{14}H_{12}O_3$ kapalı formülüne sahip, 228,25 g/mol molekül ağırlığına sahip bir polifenolik bileşiktir (Şekil 2.6). Kırmızı şarap, üzüm, fıstık, kiraz ve dut gibi meyveleri içeren birçok içecek ve gıda maddelerinde bulunan çoğunlukla bitki kaynaklı bir antimikrobiyal maddedir. Bu bileşiğin antimikrobiyal etkileriyle birlikte antioksidan özelliklerinin olduğu ve aynı zamanda bu bileşiğin bazı kanser ve kalple ilgili hastalık ve rahatsızlıkların önlenmesi için yararlı olduğu düşünülmektedir (Jang vd., 1997; Baur ve Sinclair 2006; Sadruddin ve Arora 2009).



Şekil 2.6. Resveratrol kimyasal yapısı

Resveratrol, bağışıklığı güçlendirebilmekte ve bağışıklık hücrelerindeki serbest radikalleri temizleyebilmektedir. Böylece, hücre koruyucu etkisi göz önüne alındığında, resveratrolün elde ettiği hücresel cevaplar, bu konu üzerinde daha yoğun araştırmalara neden olmuştur (Alagawany vd., 2015). Resveratrol, karaciğer, akciğer ve bağırsaklarda metabolize edilebilmekte ve bağırsaklardan hızlıca emilebilmektedir (Alagawany vd., 2015).

2.12.1.4. Fenolik asitler

Üzüm gibi meyvelerdeki fenolik bileşiklerin içeriği, bitki türüne, toprak çeşidine çevresel iç ve dış faktörlere ve hasat zamanlarına göre farklılık göstermektedir. (Castrejon vd., 2008). Fenolik bileşikler, bitkiler tarafından üretilen sekonder

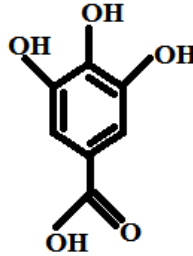
metabolitlerdir. Bu bileşikler, bitkiyi kuraklık, UV, patojenler ve hastalıklardan korumaktadır. (Dietrich vd., 2004; Szajdek ve Borowska, 2008).

Fenolik asitler, bitkilerde bol miktarda bulunmakta ve yapılarında bir veya daha fazla hidroksil (-OH) yapılı aromatik halka bulunduran bileşiklerdir (Ekbul, 2004). Bitki fenoliklerin antimikrobiyal bir aktivite gösterdiği ve bitkileri fitopatogenik bakterilerden koruduğu bilinmektedir. Antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve antitümoral ilaçlar olarak kullanılmaktadır. Bitki fenollerinin tıbbi özellikleri büyük oranda antioksidan aktiviteleri ile ilgilidir (Croft, 1998).

Fenolik asitler iki gruba ayrılmaktadır; benzoik asit türevleri ve sinamik asit türevleridir. Fenolik asitlere hidroksi benzoik asit türevleri olarak gallik asit, hidroksi sinamik asit türevleri olarak klorajenik asit, kafeik asit, kafeik asit fenetil ester örnek olarak verilebilmektedir (D' Archivio vd., 2007; Kang vd., 2011).

2.12.1.4.1. *Gallik asit*

Gallik asit (3,4,5-trihidroksibenzoik asit), Şekil 2.7.'deki gibi $C_7H_6O_5$ kapalı formülüne sahip, 170,12 g/mol molekül ağırlığına sahip polifenolik bir antioksidan bileşiktir.



Şekil 2.7. *Gallik asit kimyasal yapısı*

Gallik asit (GA), protokateşik asit ve p-hidroksibenzoik asitten oluşan hidroksibenzoik asitler, hidrolize edilebilen tanenler (mangolardaki gallotanenler ve kırmızı meyvelerdeki çilek, ahududu ve böğürtlen gibi ellajitanenler) gibi karmaşık yapıların bileşenleridir. Farklı yapılan çalışmalara göre GA, gül, nar, sumak, yeşil çay, sebze ve bitkisel ürünlerde doğal olarak bulunan doğal antitümör özellik gösteren bir bileşiktir (Chang ve Kibel, 2008); GA, mide, kolon, göğüs, serviks ve özafagus kanserini (Pal vd., 2010) ve diğer türleri kapsayan antikanser hücreleri gibi biyolojik aktiviteler alanında, yüksek etkinliği olan doğal ve enzim olmayan bir antioksidandır.

Gallik asit, biyolojik ve kimyasal özellikleriyle birlikte kuvvetli, doğal bir antioksidandır. Antioksidanlar, metabolizma sonucu oluşan vücutta zararlı serbest radikalleri zararsız hale getirmektedir (Polewski, Kniat ve Slawinska, 2002). GA ise çok iyi bir serbest radikal tutucudur (Isuzugawa, Inoue ve Ogihara, 2001). GA, antioksidan özelliğinden dolayı gıda, kozmetik ve farmasötik alanlarında da kullanılmaktadır (Zhao, Khan ve Fronczek, 2011).

Tanenler, bitki polifenollerin en büyük gruplarından birini temsil etmektedir. Tanenler yoğunlaşmış tanenler (proantosiyanidinler veya kateşinler) ve hidroliz olabilen tanenler (gallik asit ve ellajik asit türevleri) olmak üzere alt gruplara ayrılmaktadır (Nagy, Grancai ve Mucaji, 2011). Tanenler hem Gram (+) hem Gram (-) bakterilerde antibakteriyel etkiye sahiptir (Taylor, Hamilton-Miller ve Stapleton, 2005).

Bazı kimyasal ilaçlar, çeşitli hücre ölümü modellerine neden olmaktadır. Bazı kimyasal ilaçların nekrotik hücre ölümüne neden olduğu, diğerlerinin ise apoptozu tetiklediği bilinmektedir. Tümör dokusunda apoptotik hücre ölümünü tetikleyen ilaçların tümü kanser kemoterapisinde tercih edilmektedir (Chang ve Kibel, 2008). Bununla birlikte GA, normal fibroblast veya endotel hücrelerine karşı sitotoksiste göstermemektedir. (Inoue vd., 2000).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Mikrobiyolojik Çalışmalar

3.1.1. Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılanlar

3.1.1.1. Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan cihazlar

Otoklav (Hirayama, Hindistan), Hassas terazi (Sartorius, Almanya), Derin dondurucu buzdolabı (Arçelik, Türkiye; Liebherr, Almanya), Laminar Flow Kabin (Heraeus Hera Safe, Almanya), Mikrobiyolojik İnkübatör FD53, WTC (Binder, Hollanda), Binoküler Işık Mikroskobu (Zeiss, Almanya), McFarland Densitometre DEN 1B (Biosan, Letonya), Vorteks, (TTS 2- Yellowline Jeiotech, Kore) Mikroplaka Okuyucu (ELISA) (Biotek, Belçika), Bunzen Beki.

3.1.1.2. Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler

Çoklu pipet (12 Kanallı) (Axygen, Axypet, ABD), 10, 100, 200 µL'lik mikropipet ucu (Tarsons, Hindistan), 1000 µL'lik mikropipet ucu (Thermo Scientific, ABD), 10, 100, 1000 ve 5000 µL'lik Otomatik Pipetler (Nichipet EX, Japan; Genex Beta, İngiltere), 5 ve 10 mL'lik steril enjektör (Ayset, Türkiye), Filtre (Sartorius stedim, Almanya), Lamel (Isolab, Almanya), 6, 24 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası (Nest, China), Parafilm (Pechiney, Fransa), Petri (Isolab, Almanya), 5 ve 10 mL'lik cam tüp, Öze.

3.1.1.3. Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve kullanılan besiyerleri

Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, Almanya), Gallik asit (Acros Organics), Resveratrol (Sigma-Aldrich, Almanya), Kurkumin (Sigma-Aldrich, Almanya), Kloramfenikol (Acros Organics), Resazurin (Alfa Aesar), Gram Boyama Seti (Kristal viyole, Gram İyodin, Etanol, Safranin) (Norateks Gram Boyama Seti), Glikoz (Sigma), Sodyum Klorür (Sigma), PBS (Phosphate Buffer Solution), %95 etanol, Biyofilm canlılık kiti: SYTO-9, Propidyum İyodid (PI) (Thermo Fisher Scientific, ABD).

3.1.1.3.1. %0,25 Glikoz eklenmiş TSB (Tryptik Soy Broth)

30 g Tryptik Soy Broth (TSB, Lab M) tartılıp saf su ile 1 L'ye tamamlayıp 2,5 g Glikoz (Sigma, İngiltere) eklenerek, otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121 °C'de, 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

3.1.1.3.2. MHB (Mueller Hinton Broth) ve MHA (Mueller Hinton Agar)

21 g Muller-Hinton Broth (MHB, Lab M) tartılıp saf su ile 1 L'ye tamamlanarak otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121 °C'de, 15 dakika süre ile steril edilmiştir. MHA (Mueller Hinton Agar) için, besiyeri içeriğinin %2'si kadar Agar (Himedia), eklenmiştir.

3.1.1.3.3. Fizyolojik tuzlu su (SF)

Sodyum klorür (NaCl) 9 g tartılıp saf su ile 1 L'ye tamamlanıp, otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121 °C'de, 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

3.1.1.4. Standart bakteri suşları

Bu çalışmada 4 bakteri suşu kullanılmıştır. Bu bakteriler, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı koleksiyonundan temin edilmiştir. Bu mikroorganizma kültürleri Çizelge 3.1. 'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri ve suşları

Bakteri türleri	ATCC Numaraları
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299

3.1.2. Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan yöntemler

3.1.2.1. Gram boyama

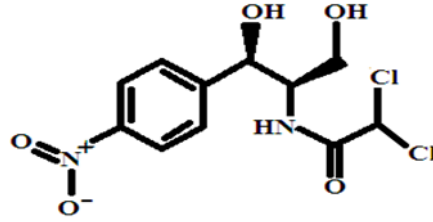
Çalışmada kullanılan bakterilere öncelikle Gram Boyama yapılarak, bakterilerin saflığı kontrol edilmiştir. Gr (+) bakteriler, kristal viyole ile mor, Gr (-) bakteriler safranin ile pembe kırmızı rengini alır.

Stoktan alınıp MHA'ya tek koloni ekim tekniği kullanılarak aktarılan bakteriler bir gece 37 °C'de, inkübatörde bekletildikten sonra oluşan tek koloniler bir öze yardımıyla alınıp önceden bir damla su damlatılan lama sürülmüştür. Daha sonra kuruması beklenmiş ve bakterileri fıkse etmek için Bunzen Beki aracılığıyla 3 defa alevden geçirilmiştir. Böylece mikrobiyal hücreler lama yapışmış olur. Daha sonra boyama setine yerleştirilerek boyama işlemine geçilmiştir; Öncelikle lamın üzerindeki bakteri sürüntüsünü kaplayacak şekilde Kristal viyole damlatılıp 60 saniye (sn) bekledikten sonra lam yıkanıp kurutulmuştur. Daha sonra sırasıyla; Gram İyodin damlatılıp yine 60 sn bekledikten sonra lam yıkanıp kurutulmuştur. Böylece eğer bakteri Gr (+) ise bu aşamadan sonra bakteri mor rengini almış olacaktır. Daha sonra etanol damlatılıp 15 sn kadar bekledikten sonra lam yıkanıp kurutulmuştur. Buradaki amaç eğer bakteri Gr (-) ise duvar yapılarındaki lipitten dolayı renklerini verip renksizleşecektir. Gram (+)'lerde bulunan teikoik asit alkol ile dekolarizasyona direnç gösterir. Gram (-) bakterilerin hücre duvarında bol miktarda bulunan lipidler ise alkol karşısında çözünürler ve bakteriler almış oldukları mor renkli boyayı geri bırakırlar. En son aşama olan Safranin damlatılarak 60 sn bekledikten sonra distile su ile yıkanıp kurutularak Işık Mikroskobu'nda da görüntüler 25x, 40x ve 100x objektifle büyütülerek kolonilerin morfolojik yapıları incelenmiştir. Daha sonra tekrar bu bakteri izolatlarından alınan tek kolonilerle MHA'ya ekim yapılmıştır. Bir gece 37 °C sıcaklıktaki inkübasyonda bekletilmiştir.

3.1.2.2. Kullanılan polifenol bileşiklerin ve kontrol antibiyotiğin hazırlanması

Kloramfenikol, $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ molekül formülüne (Şekil 3.1.) ve 323,132 g/mol molekül ağırlığına sahip bakterilerin metabolizma ürünü olarak elde edilen sentetik bir antibiyotiktir. Kloramfenikol izolasyonunun doğal kaynağı *Streptomyces venezuelae*'dir. Genelde protein sentezini inhibe ettiğinden dolayı bakteriyostatik olmasının yanında birkaç mikroorganizmaya karşı bakterisidaldir (Das ve Patra, 2017).

Geniş spektrumu ile hem aerobik hem anaerobik gram negatif ve pozitif bakterilere etkilidir (Ayaz, 2008). Bu çalışmada bu antibiyotik pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Kloramfenikol molekül yapısı

Toz halindeki polifenol bileşikler (kurkumin, gallik asit, resveratrol) ve kloramfenikol 1 mL dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek belirlenen konsantrasyonlarda ana stoğu hazırlanmıştır. Bu stok solüsyondan, steril distile su kullanılarak çeşitli seyreltme işlemleri yapılmış, madde konsantrasyonları ayarlanmıştır.

3.1.2.3. Mikrobroth Dilüsyon Tekniği ile Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi

Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK), aerobik bakteriler için Klinik Laboratuar Standartları Enstitüsü (CLSI) standartlarına göre Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir (CLSI, 2006). Kurkumin, gallik asit, resveratrol ve kloramfenikol için 96 kuyucuklu “U” tipi mikrolakalarda bir seri dilüsyon yapılmış ve bu seri dilüsyonlar belirlenen ilk konsantrasyona göre ayarlanmıştır. Gram boyaması yapılan bakteri izolatlarından alınan tek kolonilerden MHA’ya ekim yapılmıştır. Bir gece 37 °C sıcaklıktaki inkübasyonda bekletilmiş ve daha sonra bakteri izolatları, fizyolojik tuzlu su içerisinde McFarland 0,5 standartına göre hazırlanarak mililitredeki mikroorganizma sayısı 10^8 ’e (10^8 CFU/mL) ayarlanmıştır. Bakteri süspansiyonu 10 kat seyreltilerek (1/10) bakteri yoğunluğu 10^7 CFU/mL ‘ye ayarlanmıştır. Daha sonra 10^7 CFU/mL olan bakteri süspansiyonu, 96’lık plakada bulunan 100 µL polifenol bileşik serilerinin ve antibiyotik serisinin üzerine 100 µL aktararak bakteri yoğunluğu 2 kat seyrelerek (1/2) 5×10^6 CFU/mL olmuştur. Dolayısıyla polifenol ve antibiyotik serilerinin konsantrasyonları da 2 kat seyreltiği için (1/2) yarıya düşmüştür. Negatif kontrol grubu olarak MHB besiyeri; pozitif kontrol grubu olarak da mikroorganizmalı besiyeri kullanılmıştır. Ayrıca, polifenol bileşikleri DMSO’da çözülmesi için de %0,1 DMSO kontrol grubu oluşturularak 4 tekrarlı şeklinde 96’lık plakalara aktarılmıştır. 24

saat 37 °C sıcaklıktaki inkübasyon sonrasında mikropalakalar, ayrı olarak, hem resazurin hem de SYTO-9/PI boyasıyla boyanmıştır.

3.1.2.3.1. Resazürin ile MİK belirlenmesi

İnkübasyondan sonra kuyucuklara 20 µL resazürin boyası eklenmiş, 4 saat daha inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda kuyucuklardaki üremeyi inhibe eden en düşük madde konsantrasyonu, MİK, renk değişimlerine göre yorumlanmıştır.

3.1.2.3.2. SYTO-9/PI ile canlı ve ölü hücre belirlenmesi

İnkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltılıp PBS ile yıkandıktan sonra 3 µL SYTO-9 ve 3 µL PI boyası, 1 mL steril distile suda çözüldükten sonra içinde 100 µL PBS bulunan plakalara 10 µL olarak dağıtılmıştır. 30 dk 25 °C’de karanlıktaki inkübasyonundan sonra ependorflara alınarak akış sitometresinde analiz edilmiştir.

3.1.2.4. Biyofilm oluşturma

Biyofilm oluşumu, modifiye edilmiş mikropalaka yöntemiyle belirlenmiştir (Stepanovic vd., 2007). Gram boyaması yapılan bakteri izolatları bir gece 37 °C sıcaklıktaki inkübasyonda bekletildikten sonra bakteri izolatları %0,25 glikoz eklenmiş TSB (Triptik Soy Broth) besiyeri içerisinde McFarland 0,5 standartına göre hazırlanarak mililitredeki mikroorganizma sayısı 10^8 ’e (10^8 CFU/mL) ayarlanmıştır. Bu bakteri süspansiyonu 10 kat seyreltilerek (1/10) bakteri yoğunluğu 10^7 CFU/mL olmuştur. Son hazırlanan bakteri yoğunluğundan mikropalakalara 200 µL dağıtılmıştır. Negatif kontrol %0,25 glikoz eklenmiş TSB besiyeri kullanılmıştır. 48 saat 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Süre sonunda mikropalakalar, 200 µL steril fosfat tamponu (PBS) 2-3 kez yıkanmış ve ters çevrilerek kurutulmuştur. Kuyucuklar üzerine biyofilmin fiksasyonunu sağlamak amacıyla 150 µL etanol ilave edilmiştir. 20 dakika sonunda boşaltılıp ters çevrilerek oda sıcaklığında kurutulmuştur. Diğer aşamada ise her kuyucuğa 150 µL gelecek şekilde %0,1’lik kristal viyole çözeltisi eklenmiş ve 15 dakika bekletilerek oluşan biyofilmin boyanması sağlanmıştır. Sonra musluk suyu ile yıkanmış ve kurutulmuştur. En son aşamada ise spektrofotometrede ölçüm yapmadan 30 dakika önce kuyucuklara 150 µL %95’lik etanol eklenmiştir. 570 nm’ de okunan dansite değerlerine göre biyofilm oluşumu güçlü, orta, zayıf ve negatif olarak değerlendirilmiştir. Deneyler birbirinden bağımsız 3 tekrar olarak çalışılmıştır.

3.1.2.5. Antibiyofilm aktivitesi

Antibiyofilm aktivitesi; minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonunun (MBEK) belirlenmesi ve SYTO9/PI boyaları kullanılarak akış hücremetrede belirlenmek üzere iki şekilde yapılmıştır.

3.1.2.5.1. Resazürinle belirlenen MBEK aktivitesi

Polifenol bileşiklerin antibiyofilm aktivitesi, minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEK), 96 kuyucuklu mikrolakalarda mikrodilüsyon yöntemiyle CLSI standartlarına göre belirlenmiştir (Stepanovic vd., 2007; CLSI, 2012). Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar, bir gece 37 °C sıcaklıktaki inkübasyonda bekletildikten sonra serum fizyolojik su içerisinde McFarland 0,5 standartına göre hazırlanarak mililitredeki mikroorganizma sayısı 10^8 'e (10^8 CFU/mL) ayarlanmıştır. Bakteri süspansiyonları, %0,25 glikoz eklenmiş TSB besiyeri içerisinde 20 kat seyreltilerek (1/20), bakteri yoğunluğu 5×10^6 CFU/mL ayarlanmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonu 200 µL gelecek şekilde mikrolakalara dağıtılmıştır. Negatif kontrol olarak %0,25 glikoz eklenmiş TSB kullanılmıştır. 48 saat 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Süre sonunda mikrolakalar, 200 µL steril fosfat tamponu (PBS) 2-3 kez yıkanmış ve ters çevrilerek kurutulmuştur. Daha önceden hazırlanan kurkumin, gallik asit, resveratrol ve kloramfenikolün rezervuarlarda bir seri dilüsyonu yapılmıştır. Bu seri dilüsyonlar belirlenen ilk konsantrasyona göre ayarlanmıştır. Daha sonra hem madde kontrolü için hem de polifenol bileşiklerin antibiyofilm aktivitesi için kuyucuklara 100 µL madde konsantrasyonlarından ve 100 µL de besiyerlerinden eklenip, mikrolakalar 24 saat 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Daha sonra 20 µL resazurin boyası eklenip 4 saat daha inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda kuyucuklardaki renk değişimlerine göre sonuçlar yorumlanmıştır. Aynı zamanda mikrolakalar, ELISA'da 570 nm dalga boyunda okutulmuştur.

3.1.2.5.2. SYTO-9/PI ile belirlenen antibiyofilm aktivitesi

Bu işlem için biyofilm canlılık kiti olan SYTO-9 ve PI boyasıyla boyanarak hücre canlılıkları analiz edilmiştir (Thermo Fisher Scientific, ABD). 96'lık plakada bulunan 100 µL polifenol bileşik serilerinin ve antibiyotik serisinin üzerine, bakteri yoğunluğu 10^7 CFU/mL'ye ayarlanmış bakteri süspansiyonundan 100 µL aktararak bakteri

yoğunluğu 5×10^6 CFU/mL olarak ayarlanmıştır. Daha sonra mikropalakalar 48 saat 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Süre sonunda mikropalakalar, 200 µL PBS ile 2-3 kez yıkandıktan sonra mikropalakalara 100 µL PBS eklenmiştir. 3 µL SYTO-9 ve 3 µL PI boyası, 1 mL steril distile suda çözündükten sonra içinde 100 µL PBS bulunan plakalara 10 µL olarak dağıtılmıştır. 30 dk 25 °C’de karanlıktaki inkübasyonundan sonra ependorflara alınarak akış sitometrisinde analiz edilmiştir.

Biyofilmin akış sitometri analizi, hücre zarı hasarının miktarına bağlı floresan yoğunluğunun bir fonksiyonu olarak ölü, hasarlı ve canlı hücreleri ayırt etmek ve miktarını belirtmek için kullanılmaktadır. SYTO-9/PI, hasarlı hücreleri ve canlı hücreleri belirlemekle birlikte ve hücresel canlılığı değerlendirmek için kullanılmaktadır. PI, geçirgen bir hücre zarı ile ölü hücreleri; SYTO-9 ise hasarlı hücreleri boyamaktadır (Xue vd., 2012). Akış sitometrisi (FCM), bir biyofilmdeki hücresel alt popülasyonları saymak için hızlı ve kesin bir alternatif sunabilmektedir. (Muller ve Nebe-von-Caron, 2010).

3.2. *İn-vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.1. Hücre kültürü çalışmasında kullanılanlar

3.2.1.1. *Hücre kültüründe kullanılan cihazlar*

Otoklav (Alp), Derin dondurucu buzdolabı (Altus, Arçelik), Hassas terazi (Ohaus), Laminar Flow Kabin (Heal Force), Steril CO₂ İnkübatörü (Thermo Scientific), Su banyosu (Nuve), Cedex (Innovatis), Akış Sitometri Cihazı (BD Accuri C6, ABD), İnverted Mikroskop (Leica), Vorteks (Daihan), Mikropalaka Okuyucu (ELISA) (Biotek), Masaüstü soğutmalı santrifüj (Eppendorf).

3.2.1.2. *Kullanılan sarf malzemeler*

Çoklu Pipet (12 Kanallı) (Axygen, Axypet), 5 ve 10 mL’lik steril enjektör (Ayset), 5, 10 ve 25 mL’lik serolojik pipetler (Nest, China), 6, 24 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası (Nest), 10, 100, 200, 1000 ve 5000 µL’lik Otomatik Pipetler (Eppendorf), 10, 100, 200 µL’lik mikropipet ucu (Tarsons), 1000 µL’lik mikropipet ucu (Thermo Scientific), Cedex lamı (Roche, Almanya), Filtre (Sartorius stedim, Almanya), Lamel (Isolab), Kryotüp (2 mL) (Greiner bio-one, Amerika), Şarjlı pipetör (Starlab, Almanya; Dlab), Parafilm (Pechiney, Fransa), 2 mL’lik Ependorf tüp (Greiner bio-one,

ABD), 25 cm²-75 cm²'lik hücre kültür flaskı (Nest, China), geçirgen kuyucuklu plaka (Transwell) (CoStar).

3.2.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, Almanya), Fetal Bovine Serum (FBS) (Pan Biotech), Trypan Blue (Biochrom AG), Gallik asit (Acros Organics), Resveratrol (Sigma-Aldrich), Kurkumin (Sigma-Aldrich), Kloramfenikol (Acros Organics), Mesalazin (5-ASA), Resazurin (Alfa Aesar), RPMI-1640 Medyum (1X) (HyClone, Thermo Scientific) Tripsin- EDTA 10X (Pan, Biotech), Amfoterisin B (HyClone), Penisilin Streptomisin (HyClone), Piromisin (Invivo Gen), WST-1 Sitotoksosite Kiti (25 ml) Cat no:11644807001 (Roche, Almanya), MTT (Sigma Aldrich), β -Merkaptoetanol (Applchem, Almanya), Antihuman kitleri: (IL-1 β (Biolegend), IL-10 (Biolegend), IL-6 (Biolegend), IL-8 (Biolegend), TNF α (Bechman Coulter))., *E. coli* Lipopolisakkariti (LPS) (Sigma).

3.2.2. Hücre kültürü çalışmasında kullanılan yöntemler

3.2.2.1. Çalışmada kullanılan Hücre Hatları

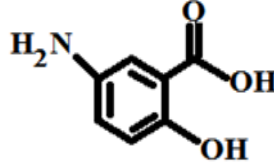
İnsan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı olan Caco-2, (ATCC kodu: HTB-37) ve insan Monosit Hücre Hattı THP-1 (ATCC kodu: TIB-202) ATCC (American Tissue Culture Collection)'den sağlanmıştır.

3.2.2.2. Kullanılan polifenol ve kimyasal bileşiklerin hazırlanması

Mesalazin, mesalamin ve 5-Aminosalisilik asit (5-ASA) aynı bileşik olarak bilinmektedir. Bu molekülün kapalı formülü C₇H₇NO₃'dur (Şekil 3.2). 153,135 g/mol moleküler ağırlığa sahiptir. Halen, Mesalazin, ülseratif kolitten muzdarip hastalarda (Velayos, Terdiman ve Walsh, 2005), antiinflamatuvar tedavide sıklıkla kullanılan antiinflamatuvar bir ilaç olarak önemli bir rol oynamaktadır (Lim vd., 2016).

5-ASA'lar, İBH'yi tedavi edici bir bileşik olarak kabul edilmektedir. Bu tür bileşikler, sitokinlerin salınımını düzenlemektedir (Sutherland ve MacDonald, 2003). Mesalazin, ülseratif kolitteki şiddetin azalmasını sürdüren aynı zamanda bu hastalarda kolitle ilişkili tümörlerin gelişme riskinin azaltılmasında rol oynayan etkin bir ilaçtır

(Velayos, Terdiman ve Walsh, 2005). Bu nedenle bu çalışmada mesalazin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Mesalazin kimyasal yapısı

Toz halindeki polifenol bileşikler (kurkumin, gallik asit, resveratrol) ve mesalazin 1 mL dimetilsülfoksit (DMSO; Sigma) içinde çözülerek 100 mM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Bu stok solüsyondan, besiyeri kullanılarak çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak sırasıyla 1,95; 3,9; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µM konsantrasyonları elde edilmiştir.

3.2.2.3. Caco-2 ve THP-1 hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlık

Kolorektal adenokarsinom hücre hattı (Caco-2), %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisillin/streptomisin, %0,1 piromisin ve %1 amfoterisin-B içeren RPMI-1640 besiyerinde; THP-1 hücreleri, %10 FBS, %1 penisillin/streptomisin, %0,1 piromisin, %1 amfoterisin-B ve %0,0004 merkaptotanol içeren RPMI-1640 besiyerinde %5 CO₂'li etüvde, %95 bağıl nem'de 37 °C sıcaklıktaki kültür ortamında çoğaltılmıştır. Kültür kabı %70 oranında hücre yoğunluğuna sahip olduğu zaman (yaklaşık 2-3 gün) alt kültürlerle ayrılarak büyümesi sağlanmaktadır. Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı -80 °C'de stoklanarak çalışmanın sonraki deneyleri için stoklanmıştır.

3.2.2.4. Hücre sayımları

Flasklarda bulunan Caco-2 hücreleri PBS ile yıkanmıştır. Caco-2 hücreleri için kültür kabının büyüklüğüne ve hücrenin yoğunluğuna bağlı olarak, flaska 250-450 µL 1X tripsin konmuş, bir iki dakika inkübatörde bekletilerek hücrelerin yapıştıkları flasktan kalkmaları sağlanmıştır. Tripsinin etkisini nötralize etmek için, kalkan

hücrelerin üzerine hemen besiyeri ilave edilerek, besiyeri-hücre karışımı santrifüj tüpüne aktarılmıştır. THP-1 hücreleri ise non-adhere hücre olma özellikleri nedeniyle flasktan direkt santrifüj tüpüne alınmışlardır. 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, süpernatant dökülüp pellet üzerine 1 mL taze besiyeri eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır. WST-1 ve MTT yöntemleri uygulanmadan önce THP-1 ve Caco-2 hücreleri tripan mavisi solüsyonu ile boyanarak hücre sayıcı cihaz (Cedex-Roche) ile sayılmıştır.

3.2.2.5. MTT ve WST-1 yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

Memeli hücresinin hayatta kalması ve çoğalması için kantitatif bir kolorimetrik test geliştirmek için bir tetrazolyum tuzu kullanılmaktadır. Test, ölü hücreleri değil, canlıları tespit etmekte ve hücrelerin aktivasyon derecesine bağlıdır (Mossman, 1983).

Bu nedenle bu testlerden biri olan MTT yöntemi, sitotoksiste, proliferasyon veya aktivasyon ölçmek için kullanılabilir. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] testi, çözünür sarı MTT tetrazolyum tuzunun, mitokondriyal süksinik dehidrojenazının çözünmeyen mavi bir MTT formazan ürününe indirgenmesine ve yükseltgenmesine dayanmaktadır. MTT solüsyonu 5 mg/mL olacak şekilde PBS içinde çözülüp filtre edilerek stok boya hazırlanmıştır. MTT canlı hücrelerle inkübe edildiğinde koyu mavi formazan ürünü üreten soluk sarı renkli substrattır. MTT formazan reaksiyon ürünü, ortamda sadece kısmen çözünmektedir ve bu yüzden alkol veya DMSO, formazanı çözmek ve optik yoğunluk ölçümü için, kullanılmaktadır (Mossman, 1983). Bu çalışmada, Caco-2 hücresi adhere olması nedeniyle sitotoksiste testi için MTT yöntemi kullanılmıştır.

WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate), kültür süpernatantında serbestçe yayılan toksik olmayan, suda çözünür, membran geçirgen ürünlere metabolize edilmektedir (Galluzi vd., 2009). Bu bileşik hücre canlılığı analizinde ve nötrofiller tarafından süperoksit üretimi ölçümü için kullanılmaktadır (Berridge ve Tan, 1998). THP-1 hücresi süspanse bir hücre olması nedeniyle sitotoksiste testi için WST-1 yöntemi kullanılmıştır.

3.2.2.6. Sitotoksiste yöntemlerinin uygulanması

Caco-2 hücreleri %10'luk FBS, %1 Penisilin Streptomisin, %0,1 piromisin ve %1 amfoterisin-B içeren RPMI-1640 ortamında, 37 °C' de %5 CO2 inkübatöründe kültüre

edilmiştir. Hücreler yeterince çoğaldıktan sonra hücre sayımı yapılarak, 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında ekilmiştir. Caco-2 hücrelerini yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda tüm kuyucuklar boşaltılmıştır. DMSO’da çözülerek hazırlanmış olan polifenol bileşikler stok solüsyonundan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak uygun polifenol bileşiklerin konsantrasyonları (1,95; 3,9; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 μ M) hazırlanmış ve 100 μ L kuyucuklara dağıtılmıştır. Kontrol grubundaki hücelere de %0,1 oranında DMSO içeren besiyeri uygulanmıştır. Madde kontrolleri için de sadece madde konsantrasyonları ve besiyeri içeren karışım steril kuyucuklara dağıtılmıştır. Daha sonra plakalar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süreleri sonunda madde kontrolleri için kuyucukların üzerine 10 μ L MTT eklenmiş, diğer tüm kuyucuklar boşaltılıp kuyucukların üzerine, 10 kat (1/10) besiyeri ile seyreltilmiş MTT solüsyonu, 100 μ L ilave edilerek, hücreler 3 saat inkübatörde inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda plakaları boşaltıp üzerlerine 100 μ L DMSO eklenmiştir. Plakaların absorbansı ELISA okuyucu cihazında 540 nm dalga boyunda okunmuştur. Deneyler birbirinden bağımsız 3 tekrar olarak çalışılmıştır. Renk oluşumuna göre alınan absorbans değerleri, hücre canlılığı ile direkt olarak ilişkilendirilmiştir.

THP-1 hücreleri %10’luk FBS ve %1 Penisilin streptomisin, %0,1 piromisin, %1 amfoterisin-B ve %0,0004 merkaptotanol içeren RPMI-1640 besiyerinde 37 °C sıcaklıkta %5 CO₂’li etüvde, kültüre edilmiştir. Hücreler yeterince çoğaldıktan sonra hücre sayımı yapılarak, 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında 100 μ L gelecek şekilde ekilmiştir. THP-1 hücreleri süspansiyon oldukları için gerekli seyreltmeler yapılarak uygun polifenol bileşiklerin konsantrasyonları (1,95; 3,9; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 μ M) hazırlanmış ve 100 μ L kuyucuklara dağıtılmıştır. Kontrol grubundaki hücelere de %0,1 oranında DMSO içeren besiyeri uygulanmıştır. Madde kontrolleri için de sadece madde konsantrasyonları ve besiyeri içeren karışım steril kuyucuklara dağıtılmıştır. Daha sonra plakalar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süreleri sonunda madde kontrolleri için kuyucukların üzerine 10 μ L WST-1 reaktifi diğer kuyucukların üzerine ise 20 μ L WST-1 reaktifi ilave edilerek, hücreler 3 saat inkübatörde inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda absorbanslar ELISA okuyucu cihazında 420 nm dalga boyunda, okunmuştur. Deneyler birbirinden bağımsız 3 tekrar olarak çalışılmıştır

3.2.2.7. Ko-kültür hücre kültürü modeli ile akış sitometride örneklerin sitokin seviyelerinin belirlenmesi

Sağlıklı ya da kontrollü inflamasyon durumunda bağırsakları taklit edebilen makrofajların ve bağırsak epitel hücrelerinin *in vitro* ko kültür modeli geliştirilmiştir. Çok sayıda bağırsak inflamasyon belirtisini gösterme yeteneği ile birlikte sunulan epitel hücreleri ve makrofajların ko kültür modeli, bağırsakların sağlık durumu ile ilgili etkilerini araştırmada eşsiz bir olanak sağlamaktadır. İnflamasyon, fizyolojik olarak, Gr (-) bakteri zarında bulunan endotoksin LPS tarafından uyarılarak gerçekleştirilmektedir. Model mümkün olduğunca bağırsak inflamasyon süreçlerine benzetilerek taklit edilmektedir. Böylece sistem ideal olarak kültürün ek manipülasyonu olmadan kendisini iyileştirmek ve inflamasyon sürecini çözmek zorundadır (Kampfer vd., 2017). Aynı zamanda hücre hasarı, uyarılmış THP-1 hücreleri ile ko kültür modelinde doğrudan bağlantılı olabilmektedir. (Miura, Friedlander ve Yuan, 1995).

3.2.2.7.1. Yöntemin uygulanması

THP-1 hücreleri ve Caco-2 hücreleri, %10'luk Fetal Bovine Serum ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren RPMI-1640 ortamında, 37 °C' de %5 CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiştir (THP-1 için, %0,0004 merkaptotanol eklenmiştir). Hücrelerin yeterince çoğalması beklendikten sonra hücre sayımı yapılarak hücreler 24 kuyucuklu plakalara her 2 mL'de 1×10^5 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında ekilmiştir. THP-1 hücreleri ko-kültür yönteminde kullanılan özel filtreli insert kuyucuklarının üzerine ekilmiştir. Daha sonra 24 saatlik inkübasyondan sonra kontrol grubu hariç THP-1 hücrelerine 1 µg/mL *E. coli* LPS verilmiştir. Buradaki amaç, THP-1 monosit hücrelerinde inflamasyon oluşturarak sitokin salınımını indüklemektir. 24 saat inkübasyondan sonra Caco-2 besiyeri değiştirilerek kontrol grubu hariç IC₅₀'si belirlenen gallik asit konsantrasyonu ile mesazalin konsantrasyonu verilip, THP-1 hücrelerinde olan özel filtreli insert pens yardımıyla Caco-2 hücrelerinin bulundukları kuyucuklara yerleştirilmiştir. Daha sonra THP-1 hücrelerinin olduğu kuyucuktaki besiyerinin tümü özel filtreli insert içine toplanmıştır. 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bırakılan süreler sonunda hücrelerin analizini yapmak için, öncelikle tüm besiyerindeki THP-1 hücreleri falkon tüpüne toplanıp 1200 rpm'da 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra THP-1 hücresinin süpernatantı dökülüp pelletin üzerine 1 mL PBS eklenerek tekrar santrifüjü yapılmıştır. Daha sonra süpernatant dökülüp pelletin üzerine

500 µL cytofix/cytoperm solüsyonu eklenerek 20 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. Bu işlem hücre içi sitokinlerin seviyelerini belirlemek amacıyla ve hücre zarında por açmak amacıyla uygulanan bir işlemdir. Hücre yüzeyi için bu işlem yapılmaz. Bu sürenin sonunda hücreler santrifüj edilip süpernatantı dökülmüştür. Sonra pellete 500 µL “perm wash” solüsyonu eklenerek hücreler santrifüj edilmiştir. Son santrifüjden sonra pellet resüspanse edilmiştir. Ependorf tüplerine konulan 5 µL IL-8 hücre yüzeyi, IL-1β, IL-10, IL-6 ve TNF-α olan hücre içi sitokinlere ait monoklonal antikorların üzerine 100 µL resüspanse edilmiş süpernatandan eklenerek 20 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda akış sitometri cihazında analiz edilmiştir.

3.2.2.8. Sitotoksite yöntemlerinin istatistiksel analizi

İstatistiksel değerlendirmeler için GraphPad Prism 5.0 analiz programı kullanılarak kontrole göre grupların % hücre canlılık grafikleri çizilmiş ve istatistiksel analizler yapılmıştır. Elde edilen verilere tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak analiz edilmiştir.

İstatistiksel anlamlılık değerleri; $p > 0,05$, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ ve $p < 0,0001^{****}$ olarak değerlendirilmiştir.

3.3. İn-Vivo Çalışmalar

Çalışmanın in vivo kısmı, Anadolu Üniversitesi ile Taras Shevchenko Ulusal Kiev Üniversitesi arasında tamamlanan Mevlana Proje Tabanlı Uluslararası Değişim Programı kapsamında Taras Shevchenko Ulusal Kiev Üniversitesi’nde gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Deney hayvanları

29 adet erkek Wistar Albino türü sıçanlar (150-170 g), "Kiev Biyoloji ve Tıp Enstitüsü" Taras Shevchenko Ulusal Üniversitesi’ndeki (Kiev, Ukrayna) hayvan tesisinde yetiştirilmiştir. Hayvanlar gece/gündüz değişiminin (12 saat aydınlık / karanlık döngüleri) sağlandığı, 21-23 °C sıcaklıkta ve %30–35 nemdeki laboratuvar koşullarına tutulmuştur. Tüm hayvanların çalışma boyunca yemi ve suya erişimi sağlanmıştır.

Çalışma, Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Kılavuzuna tam olarak uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Deney tasarımı, Kiev Taras Shevchenko Ulusal Üniversitesi "Biyoloji ve Tıp Enstitüsü" ESC Biyo Etik Komitesi tarafından onaylanmıştır (2 Kasım

2018’de yayınlanan 8 numaralı protokol). Tez ekinde Etik Kurul Raporu (Etik Kurul No: 3447-IV) bulunmaktadır (Ek-7).

3.3.2. *İnvivo* deney tasarımı

Sıçanlar tedavi protokolüne göre 4 gruba ayrılmıştır (Çizelge 3.2.). Deneyin tasarımı ise Çizelge 3.3.’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Deney grupları ve hayvan sayıları

Grup Kodları	Grup İsimleri	Hayvan sayısı
Grup A	% 1 Metil Selüloz (MS) (intrarektal)	n=5
Grup B	% 6 İyodo-Asedamid (İA) (intrarektal)	n=8
Grup C	% 6 İA (intrarektal) + Gallik asit 60 mg/kg (gavaj)	n=8
Grup D	% 6 İA (intrarektal) + Gallik asit 80 mg/kg (gavaj)	n=8

Çizelge 3.3. Deney tasarımının tablo şeklinde gösterimi

Çalışma günleri	Uygulanan Yöntemler
1. Gün	Tartma, değerlendirme, intrarektal İA uygulayarak kolit modeli oluşturma ve intrarektal MS uygulanması
2. Gün	Gavaj ile gallik asit uygulanması
3. Gün	Tartma, değerlendirme ve gavaj ile gallik asit uygulanması
4. Gün	Gavaj ile gallik asit uygulanması
5. Gün	Tartma, değerlendirme ve gavaj ile gallik asit uygulanması
6. Gün	Gavaj ile gallik asit uygulanması
7. Gün	Tartma, değerlendirme ve Otopsi (diseksiyon)

7. günde sıçanlar ötenazi edilmiştir. Kolonda klinik ve makroskopik incelemeler, ülseratif kolitin başlangıcının değerlendirilmesi, miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin değerlendirilmesi ve glikoprotein seviyelerinin ölçümü şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. İyodo-asetamid (İA) ile indüklenen kolonik inflamasyon modeli

%6 İA hazırlanması için 0,3 g, iyodo-asetamid (Sigma-Aldrich, Almanya) 5 mL %1 Metilselüloz içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. 0,1 mL %6'lık iyodoasetamid tek seferde intrarektal olarak (anüsten 7 cm) 1 mL'lik şırıngaya takılmış Nelaton S-8 kauçuk kateterle uygulanmıştır. Sadece çalışmanın 1. gününde uygulanmıştır. Böylece deneysel kolit, %6 iyodo-asetamid ile indüklenmiştir. %6 İA'nın ilk belirtileri (artan vasküler geçirgenlik, mukozal ödem), İA uygulanmasından sonra 1-2 saat içinde görülmekte, kolonda ülserlere yol açmakta (6- 12 saat), ardından yoğun akut ve kronik iltihap (7-14 gün) gözlenmektedir.

3.3.4. Gallik asit uygulanması

Deneyin 2. gününden itibaren 5 gün boyunca gallik asit (60 ve 80 mg/kg) steril saf su içerisinde çözdürülüp, iki deney grubundaki her bir hayvana 1 mL gallik asit gavajı yapılmıştır.

3.3.5. Kolit başlangıcının klinik ve makroskopik olarak değerlendirilmesi

Diseksiyon aşamasında, 7 cm'lik distal kolon çıkarılmış, uzunlamasına açılmış, serum fizyolojik suyla yıkanmış ve hafifçe filtre kağıdı ile kurulanmıştır. Makroskopik kolonik lezyonlar (kolonik lezyon alanları (mm²), kolonik genişleme (mm) ve kolon yaş ağırlıkları (g/100 g) değerlendirilmiştir.

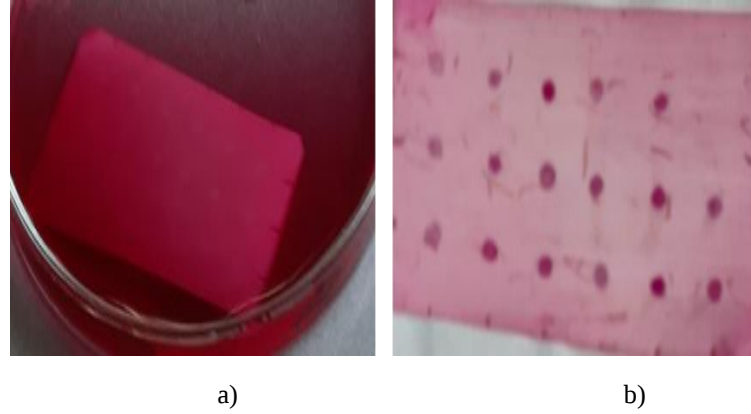
3.3.6. Vasküler geçirgenliğin *In vivo* ölçümü

Pettinger ve diğerlerinin 1975'de Wistar erkek sıçanlarda gerekli ip (intra peritoneal) üretran dozunun 0,8-1,2 g/kg arasında olduğunu belirtmektedirler (... , 1997). Kolonik vasküler geçirgenliğin kantitatif çalışmaları için, albumine bağlanan ve sızan makromoleküllerin, artan vasküler geçirgenliğini ifade etmek için Evans mavisi kullanılmıştır. Kısaca, sıçanlara üretran (1,1 g/kg, ip) ile anestezi uygulanmış ve otopside 15 dakika önce intravenöz olarak Evans mavisi (PBS içinde 0,4 mg / 100 g) enjekte edilmiştir. Karın açılmış; 7 cm kolon çıkarılmış, serum fizyolojik suyla yıkanmış, filtre kağıdı ile hafifçe kurutulmuş ve tartılmıştır. Evans mavisi, formamid kullanılarak dokudan ekstrakte edilmiş ve 610 nm'de spektrofotometreyle ölçülmüştür. Sonuçlar, mg boya/g yaş ağırlık kolonu olarak ifade edilmiştir.

3.3.7. Mukus glikoproteinlerinin periyodik asit / Schiff boyama ile araştırılması

Mukus glikoproteinleri (müsin), gastrointestinal sistemin goblet hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Mukus glikoproteinleri, mukozal bütünlüğüne katkıda bulunmakta ve lümen yüzeyindeki mikroorganizmaların büyümesini düzenlemeye yardımcı olmaktadır (Forstner, Wesley ve Forstner, 1982).

Yüzey mukusu, epitel hücre katmanından 6-N, N-asetil-1-sistein (Sandoz, İsviçre) ile ayrılmıştır. Kolon örneğinden yaklaşık bir santimetre kesit alınarak Schiff reaksiyonu yoluyla mukusun oligosakkarit kısmını kalitatif olarak belirlemek için 3 ml 6-N, N-asetil-1-sistein çözeltisine yerleştirilmiştir. Glikoproteinler, polivinylidene difluoride (PVDF) membranında Schiff reaksiyonu yardımıyla belirlenmiştir. PVDF membranı (Hybond-P, Amersham International, Little Chalfont, Büyük Britanya) önce 2 dakika boyunca %100 metanol çözeltisine, sonra 2 dakika boyunca %80 metanol çözeltisine daldırılmıştır. Daha sonra membran, 2 dakika boyunca damıtılmış suyla yıkanmış, böylece homojenleştirilmiştir. Filtre kâğıdı üzerine konulup kurutulmuştur. 10 µL örneklerden alıp PVDF membranına eklenmiş tamamen emilene kadar 10-15 dakika beklenmiştir. Membran, 2 dakika boyunca damıtılmış suda yıkanmış, daha sonra %0,5 KOH çözeltisi içeren %70 etanol içerisinde 10 dakika inkübe edilmiş ve tekrar damıtılmış su içinde 2 dakika boyunca yıkanmıştır. Daha sonra membran 10 dakika boyunca %0,5 periyodik asit çözeltisine daldırılmış, 2 dakika boyunca damıtılmış suyla yıkanmış ve 30 dakika boyunca sürekli çalkalama sırasında Schiff reaktifinin etkisine maruz bırakılmıştır. Bundan sonra, membran 3 dakika boyunca %0,6 sodyum metabisülfat içinde iki kez homojen bir şekilde bekletilmiştir. Daha sonra 2 dakika boyunca da damıtılmış su içinde yıkanmıştır. Sonra, membran 10 dakika boyunca açık havada kurutulmuş ve tarayıcı tarafından taranmıştır (Samsung SCX-4x21). Görüntüler, LI-COR Image Studio Lite Ver 5,2 yazılımı yardımı ile pozitif renkli noktaların yoğunluğu ölçülerek analiz edilmiştir.



Görsel 3.1. a) PVDF membranının Schiff reaktifinin içinde çalkalama sırasında görüntüsü;
b) Tüm işlemlerden sonra PVDF membranının görüntüsü

3.3.8. Kolonda miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin incelenmesi

Bağırsak mukozasına nötrofil infiltrasyonunun bir endeksi olarak miyeloperoksidaz aktivitesi (MPO) daha önce tanımlanan yöntem ile belirlenmiştir. (Krawisz ve ark. 1984).

İnfiltrasyon, inflamasyonda oluşan nötrofil ve lokositlerin hasarlı dokuya sistemik dokudan geçmesidir. (Doku ve organda bulunmaması gereken hücre birikmesi veya sızması).

MPO, inflamasyon ve enfeksiyon süreçlerinde anahtar bir enzimdir (Rosso vd., 2006). MPO nötrofik granülositlerin granüllerinde depolanan proinflamatuvar bir enzimdir (Schultz ve Kaminker 1962). Gallik asitleri içeren fenolik asitler, güçlü bir MPO inhibisyonu göstermektedirler (Rosso vd., 2006; Kato vd., 2003). Lipofiliklik açısından farklılık gösteren gallik asit ve n-alkil ester türevleri, iki mekanizma tarafından antiinflamatuvar aktivite göstermektedir: (1) MPO aktivitesinin güçlü inhibisyonu, (2) bu enzim tarafından üretilen ve bir reaktif oksijen türü olan hipoklöröz asitin (HOCl) temizlenmesidir (Rosso vd., 2006).

MPO aktivitesinin artması, inflamasyonun olduğunun göstergesidir (Pulli vd., 2013). MPO aktivitesinin değerlendirilmesi, inflamasyondaki etkilerinin anlaşılması için çok önemlidir ve literatürde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Ormrod, Harrison ve Miller, 1987).

Bu çalışmada ise kolondaki nötrofil infiltrasyonu, MPO aktivitesi ile ölçülmüştür. Kısaca, 300 mg HETAB (hekzadesiltrimetil amonyum bromür) reaktifinden tartılıp 60 mL 50 mM konsantrasyonunda olan fosfat tamponuna (pH 6,0) eklenerek, %0,5

HETAB çözeltisi hazırlanmıştır. Yaklaşık 50 mg kolonik doku, %0,5 HETAB çözeltisine eklenip buz üzerinde homojenleştirilmiştir. Homojenat 10 sn sonike edilmiş, üç kez dondurularak çözülmüş ve 14000 rpm'de 15 dk (4 °C) santrifüjlenmiştir. Her bir süpernatanttan 14 µL alınarak 96'lık plakalara dağıtılmıştır. Her bir kuyucuğa 200 µL reaktif tamponu (4,1 mL 1 mg/mL konsantrasyonunda olan o-dianisidin hidroklorür (ODHC), 4,4 mL 50 mM/mL konsantrasyonunda olan fosfat tamponu ve 12,2 mL %0,0005 hidrojen peroksit) eklenmiştir. MPO aktivitesi, seri olarak seyreltilmiş MPO (0,5; 0,25; 0,125; 0,06; 0,03; 0,015 U/mL) standardı kullanılarak 450 nm'de (BioTek, Synergy HT) ELISA'da ölçülmüştür. Sonuçlar MPO aktivitesi U/g doku olarak ifade edilmiştir.

3.3.9. *İn vivo* deneyin istatistiksel analizi

Kantitatif sonuçlar, aritmetik ortalama +SEM olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık, uygunluğuna göre parametrik olmayan Mann-Whitney U-testi veya Student's t-testi ile belirlenmiştir. Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık için * p<0,05 değeri eşik olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

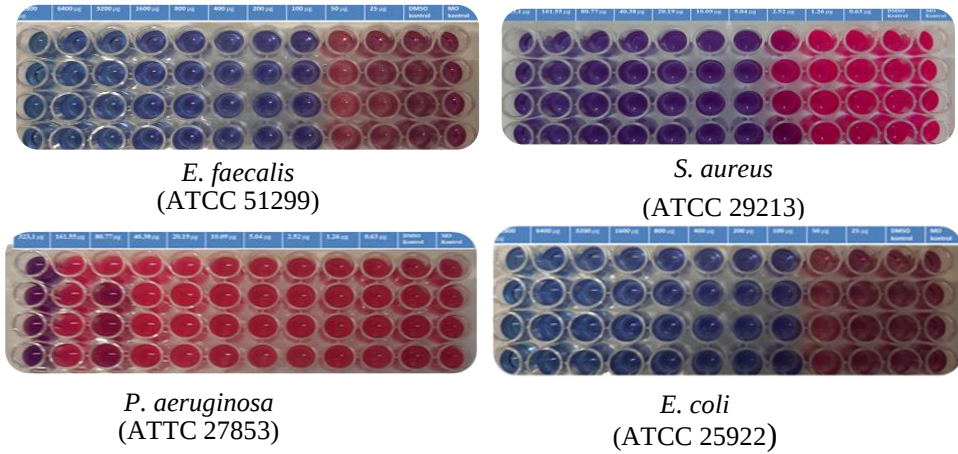
4.1. Mikrobiyolojik Çalışmalar

4.1.1. MİK sonuçlarının değerlendirilmesi

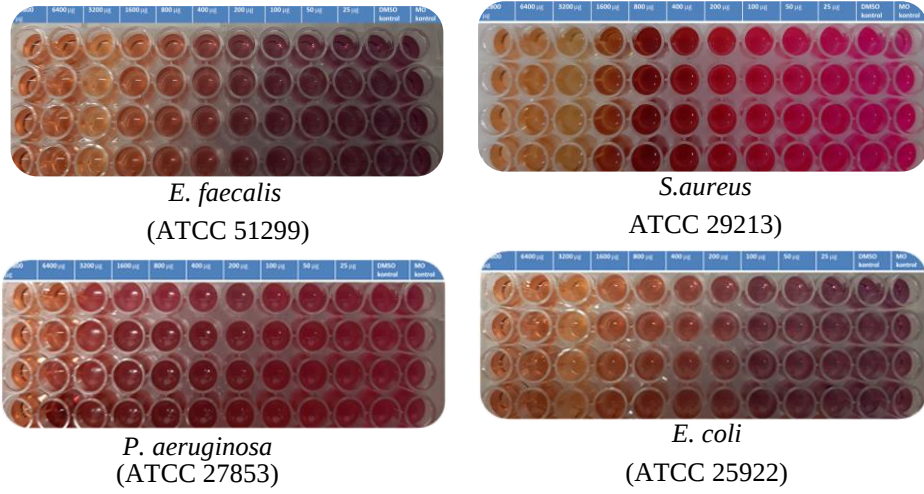
Bakterilerin MİK değerleri, resazürin boyası kullanılarak makroskopik, SYTO-9/PI boyaları kullanılarak da akış hücremetrede değerlendirilmiştir.

4.1.1.1. Resazürin boyasıyla belirlenen MİK sonuçlarının değerlendirilmesi

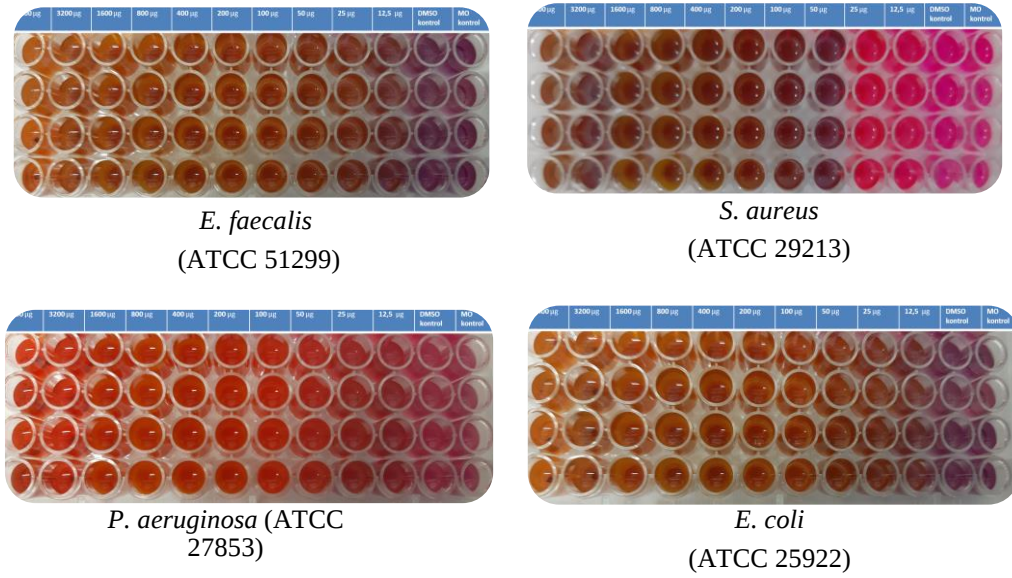
Polifenollerin bakterilere karşı belirli konsantrasyonlardaki MİK değerleri makroskopik olarak değerlendirilmiştir. Resazurinle boyanan kuyucuklar, bakterilerin canlılıklarına göre inkübasyondan sonra renk değiştirirler. Resazurin hücre canlılığını gösteren en etkili boyalardan biridir. İnkübasyon sonucunda oluşan mavi kuyucuklar bakteriyel gelişmenin olmadığını yani bakterilerin ölü olduğunu, pembe-kırmızı kuyucuklar ise gelişmenin olduğunu yani canlılığın devam ettiğini göstermektedir. İlk pembe-kırmızı kuyucuktan önceki mavi kuyucuk polifenolün MİK değeri olarak kabul edilmektedir. Görsel 4.1.-Görsel 4.4. arasında ise çalışmada kullanılan polifenollerin ve kloramfenikolun bakteriler üzerindeki MİK değerlerinin makroskopik görüntüleri verilmiştir.



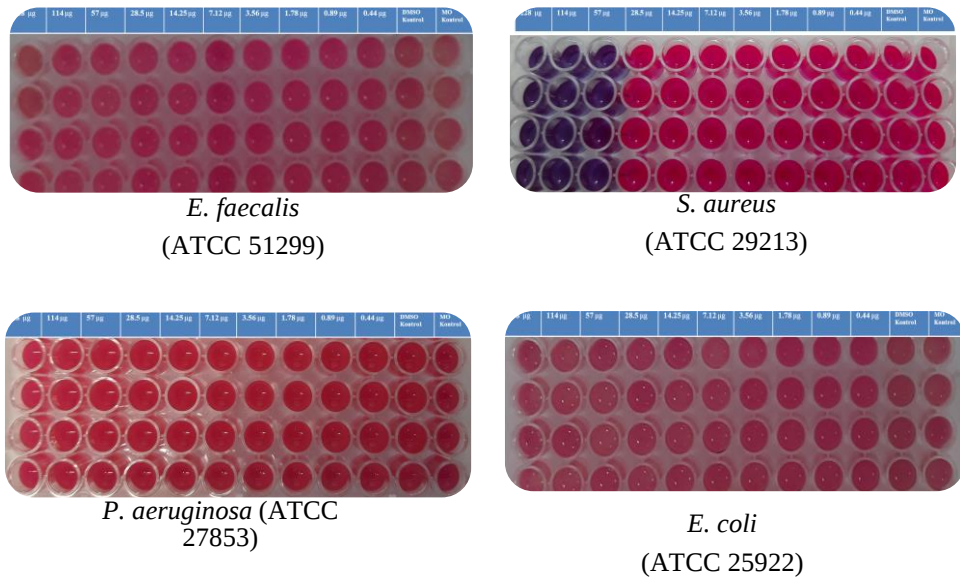
Görsel 4.1. Kloramfenikolun dört bakteri üzerindeki MİK değerlerinin makroskopik görüntüleri



Görsel 4.2. Gallik asitin dört bakteri üzerindeki MİK değerlerinin makroskobik görüntüleri



Görsel 4.3. Kurkuminin dört bakteri üzerindeki MİK değerlerinin makroskobik görüntüleri



Görsel 4.4. Resveratrolun dört bakteri üzerindeki MİK değerlerinin makroskopik görüntüleri

Makroskopik olarak değerlendirilen MİK değerleri tablo olarak Çizelge 4.1.’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Polifenollerin ve pozitif kontrolün MİK değerleri

Bakteriler	Kloramfenikol	Gallik asit	Resveratrol	Kurkumin
<i>S. aureus</i> ATCC (29213)	15,62 µM	2353 µM	250 µM	136 µM
<i>P.aeruginosa</i> ATCC(27853)	1000 µM	37647 µM	>1000 µM	68 µM
<i>E. faecalis</i> ATCC (51299)	310 µM	9412 µM	>1000 µM	68 µM
<i>E. coli</i> ATCC (25922)	310 µM	9412 µM	>1000 µM	34 µM

Çalışmada gallik asitin *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *E. faecalis*’e karşı MİK değerleri sırasıyla 9412, 37647, 2353 ve 9412 µM veya 1600, 6400, 400 ve 1600 µg/mL olarak analiz edilmiştir.

Liu ve diğerleri (2017), yaptıkları çalışmada gallik asitin *S. aureus*’a karşı MİK değerini 2000 µg/mL olarak bulmuşlardır. B. Makhoul ve diğerleri (2013), gallik asitin

S. aureus'a karşı MİK değerini 50 µg/mL olarak bulmuşlardır. Luis ve arkadaşları (2014), gallik asitin *S. aureus*'a karşı MİK değerini 4 µg/mL olarak analiz etmişlerdir.

Özçelik ve diğerleri (2011), gallik asitin *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *E. faecalis*'e karşı MİK değerlerini sırasıyla 4, 2, 16 ve 8 µg/mL olarak bulmuşlardır. Jing ve diğerleri (2016), gallik asitin *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'a karşı MİK değerlerini sırasıyla 1530, 510, 1785 µg/mL olarak bulmuşlardır.

Maisuria, Hosseinidoust ve Tufenkji (2015), yapmış oldukları çalışmada, polifenollerin bazı bakteriler üzerindeki araştırmalarında, gallik asitin *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı MİK değerlerini her iki bakteride de 5000 µg/mL olarak bulmuşlardır. Borges ve diğerleri (2013), yapmış oldukları antibakteriyel aktivite çalışmalarında, gallik asitin *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* bakterilerine karşı MİK değerlerini sırasıyla 1500 µg/mL, 500 µg/mL ve 1750 µg/mL olarak bulmuşlardır. Jayaraman ve diğerleri (2010), gallik asitin *E. coli*, *P. aeruginosa* ATCC (27853) ve *S. aureus*'a ATCC (29213) karşı MİK değerlerini sırasıyla 490, 533 ve 533 µg/mL olarak bulmuşlardır.

Çalışmamızdaki resveratrolün *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *E. faecalis*'e karşı MİK değerleri sırasıyla >1000, >1000, 250 ve >1000 µM veya >228, >228, 57 ve >228 µg/mL olarak analiz edilmiştir.

Man ve Chan (2002), resveratrolün *P. aeruginosa* ATCC (27853), *S. aureus* ATCC (29213) ve *E. faecalis*'e karşı MİK değerlerini sırasıyla 171, 342 ve 342 µg/mL olarak bulmuşlardır. Paulo ve diğerleri (2010), resveratrolün *E. coli* ATCC (25922), *P. aeruginosa* ATCC (27853), *S. aureus* ve *E. faecalis*'e karşı MİK değerlerini sırasıyla >400, >400, 100 ve 100 µg/mL olarak bulmuşlardır. Kolouchova ve diğerleri (2018), resveratrolün *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı MİK değerini sırasıyla >200 ve 200 µg/mL olarak analiz etmişlerdir. Fulghesu ve diğerleri (2007), yapmış oldukları farklı bir çalışmada ise resveratrolün QS'i inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Çalışmamızdaki kurkuminin *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *E. faecalis*'e karşı MİK değerleri sırasıyla 34, 68, 136 ve 68 µM veya 12,5, 25, 50 ve 25 µg/mL olarak analiz edilmiştir.

Karaman ve diğerleri (2013), kurkuminin *P. aeruginosa*'ya karşı MİK değerini 16 µg/mL olarak bulmuşlardır. Hosny ve diğerleri (2011), daha önceki çalışmada kurkuminin bazı yiyecek üretimlerinde *P. aeruginosa*'nın yoğunluğunu anlamlı derecede azalttığını göstermiştir. Heggel ve diğerleri (2010), kurkumin yüklenmiş daha

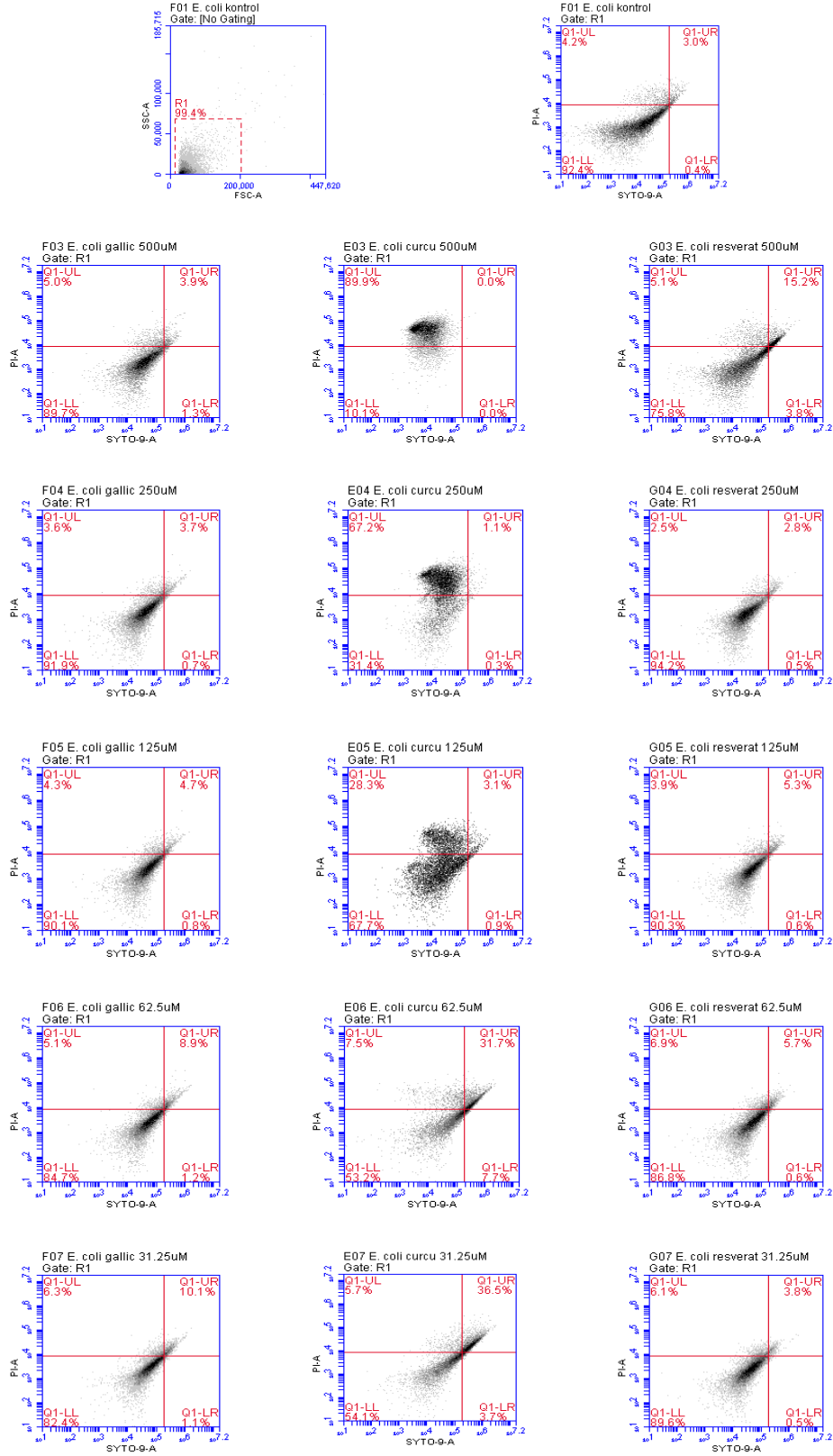
önceki çalışmalarında, kurkuminin, *E. faecalis*'i tamamen canlılığını durdurduğunu rapor etmişler.

Bu çalışmalarda ve bizim çalıştığımız çalışmada çıkan farklı MİK sonuçlarının nedeninin, bakterinin farklı suşlarının kullanılmasından veya yapılan pasajlamalar sonucunda bakterilerin kazandığı direnç veya gösterdiği mutasyonel değişikliklerden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ancak bazı polifenoller, aynı bakterinin aynı suşunda bazı çalışmalarda paralellik göstermektedir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar da literatürde rastlanılan sonuçlarla paralellik göstermektedir.

4.1.1.2. SYTO-9/PI ile belirlenen canlı ve ölü hücrelerin değerlendirilmesi

Polifenollerin bakterilere karşı belirli konsantrasyonlardaki canlılık ve ölüm oranları, SYTO-9/PI boyası kullanılarak akış sitometride değerlendirilmiştir.

E. coli hücrelerinin kantitatif floresans analizini gerçekleştirmek için SYTO-9 ve PI gibi boyaların gerekliliğine ihtiyaç duyulmaktadır. SYTO-9 ve PI boyaları birlikteyken karşılaştırıldığında, PI yoğunluğu artarken, *E. coli* hücrelerinin ölümündeki SYTO-9 yoğunluğu azalmaktadır. Böylece bu floresans tekniğiyle boyanan *E. coli* hücrelerinin ölüm ve canlılık farkı araştırmacılara ışık tutmaktadır. Sonuç olarak *in vitro* ko kültür modelinde *E. coli* LPS kullanıldığı için hücre kültürüyle paralellik sağlaması açısından polifenollerin *E. coli* bakterisi üzerinde etkinliği incelenmiş ve sonuçları Şekil 4.1.'de verilmiştir. Polifenollerin *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *E. faecalis* üzerindeki etkinlikleri sırasıyla EK-1, EK-2 ve EK-3 şeklinde verilmiştir. Aynı zamanda bu yöntemle göre tüm bakterilerin canlılık ve ölüm değerlendirilmesi ise Çizelge 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Polifenollerin *E. coli* üzerindeki etkisinin canlı ve ölü hücre olarak akış sitometride değerlendirilmesi

Çizelge 4.2. Polifenollerin bakteriler üzerindeki etkisinin, canlı ve ölü hücre olarak akış sitometride değerlendirilmesi

Mikroorganizmalar	Polifenoller	Sonuç anlamları	Kontrol	500 μM	250 μM	125 μM	62,5 μM	31,25 μM
<i>E. coli</i>	Gallik asit	% Apoptotik hücre	3,4	5,2	4,2	5,5	10,1	11,2
		% Nekroz hücre	4,2	5	3,6	4,3	5,1	6,3
		% Canlı hücre	92,4	89,7	91,9	90,1	84,7	82,4
	Kurkumin	% Apoptotik hücre	5,8	0,3	1,4	4	39,4	40,2
		% Nekroz hücre	4,1	89,6	67,2	28,3	7,5	5,7
		% Canlı hücre	90,2	10,1	31,4	57,7	53,2	54,1
	Resveratrol	% Apoptotik hücre	3,4	19	3,3	5,9	6,3	4,3
		% Nekroz hücre	4,2	5,1	2,5	3,9	6,9	6,1
		% Canlı hücre	92,4	75,8	94,2	90,3	86,8	89,6
<i>P. aeruginosa</i>	Gallik asit	% Apoptotik hücre	2,9	1	3	2	3,8	3,8
		% Nekroz hücre	0,8	1,2	1,4	1,5	2,3	2
		% Canlı hücre	96,3	97,8	95,5	96,4	94	94,1
	Kurkumin	% Apoptotik hücre	2,9	0,8	0,5	0,2	1,9	23,1
		% Nekroz hücre	0,8	59,9	33,1	15,9	21,3	20,5
		% Canlı hücre	96,3	39,3	66,4	84	76,7	56,4
	Resveratrol	% Apoptotik hücre	2,9	0,9	0,9	1	2,1	3,7
		% Nekroz hücre	0,8	5	7,1	7	8	8,8
		% Canlı hücre	96,3	94,1	92	92	89,9	87,5
<i>S. aureus</i>	Gallik asit	% Apoptotik hücre	5,3	3,6	9,2	8,5	16,4	7,5
		% Nekroz hücre	3,1	16,4	8,3	8,9	6,8	5,5
		% Canlı hücre	91,6	80	82,5	82,7	76,8	87,1
	Kurkumin	% Apoptotik hücre	1,7	3,3	4,8	10,7	29,8	57,3
		% Nekroz hücre	2,1	55,3	73,8	47,8	65,2	9
		% Canlı hücre	96,2	41,4	21,4	41,4	5	33,8
	Resveratrol	% Apoptotik hücre	0,6	3,2	2,7	4,2	2,8	4,5
		% Nekroz hücre	8,9	10,1	13	17,8	32,6	29,5
		% Canlı hücre	90,4	86,7	84,3	78	64,6	66
<i>E. faecalis</i>	Gallik asit	% Apoptotik hücre	4,2	6,1	9,4	5,4	7,5	8,9
		% Nekroz hücre	5,2	2,2	0,9	0,6	0,9	2,3
		% Canlı hücre	90,6	91,7	89,7	94	91,6	88,8
	Kurkumin	% Apoptotik hücre	4,2	0,7	1,2	2,4	3,4	3,9
		% Nekroz hücre	5,2	93,1	93,9	94,8	91,9	82,3
		% Canlı hücre	90,6	6,2	4,9	2,8	4,7	13,8
	Resveratrol	% Apoptotik hücre	4,2	2,4	5,3	7,3	6,8	8,7
		% Nekroz hücre	5,2	4,8	1,9	1,4	3,3	4,5
		% Canlı hücre	90,6	92,8	92,8	91,2	89,9	86,8

Yapmış olduğumuz SYTO-9/PI ile boyanan canlı ve ölü hücre değerlendirme çalışmasında, gallik asitin 500, 250, 125, 62,5 ve 31,25 µM konsantrasyonlarında, *E. coli* üzerindeki canlı hücre oranı sırasıyla %89,7, %91,9, %90,1, %84,7 ve %82,4; *E. faecalis* üzerinde % 91,7, %89,7, %94, %91,6 ve %88,8; *P. aeruginosa* üzerinde %97,8, %95,5, %96,4, %94, %94,1; *S. aureus* üzerinde %80, %82,5, %82,7, %76,8, %87,1 şeklinde bulunmuştur. Aynı zamanda gallik asitin 500, 250, 125, 62,5 ve 31,25 µM konsantrasyonlarında, *E. coli* üzerindeki apoptotik hücre ölümü oranı sırasıyla % 5,2, %4,2, %5,5, %10,1 ve %11,2; *E. faecalis* üzerinde %6,1, %9,4, %5,4, %7,5 ve %8,9; *P. aeruginosa* üzerinde %1, %3, %2, %3,8, %3,8; *S. aureus* üzerinde %3,6, %9,2, %8,5, %16,4, %7,5 şeklinde bulunmuştur.

Çalışmada kurkuminin *E. coli* üzerindeki canlılığı kontrole göre önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Resveratrolun *E. coli* üzerindeki canlılığı ise kontrole göre azalmıştır. Sonuç olarak bu polifenoller bakteriler üzerinde hücre canlılığını azaltmaktadır.

Wu ve diğerlerinin (2016), polifenolik bir bileşik olan *Cedrus deodara*, 3-p-trans-coumaroyl-2-hidroksikuinik asit (CHQA) ile ilgili yapmış oldukları çalışmada akış sitometrisinde SYTO-9 ve PI ile boyanan *S. aureus* üzerindeki 5000 µg/mL konsantrasyonundaki canlılığın kontrole göre %90,5 den %48,7 düştüğünü bulmuştur. Böylece kullanılan polifenol bileşiğin *S. aureus*'un hücre zarında hasar oluşturduğunu göstermişlerdir.

Zou ve diğerleri (2019), Çin yaban mersini yapraklarıyla (BLPs) ilgili yaptıkları çalışmada ise; bu polifenol bileşiğin *S. epidermidis* bakterisine karşı antibakteriyel ve antibiyofilm etkinliğini araştırmışlardır. Bu araştırmalarını çeşitli yöntemler ile çalışan araştırmacılar SYTO-9 ve PI boyasını kullanarak hücre canlılıklarıyla ilgili incelemede bulunmuştur. Çalışma sonucunda araştırmacılar, BLPs'lerin, gıdalardaki *S. epidermidis*'i kontrol etmek için doğal koruyucu olarak geliştirilme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Bakteriden üretilen New Delhi metallo-β-laktamaz (NDM-1) enzimi en çok β-laktam antibiyotiklerine karşı dirençlidir ve son zamanlarda bu enzimi üreten bakterilere karşı yeni bir bileşik bulunmamaktadır (Chandar vd., 2017). Aynı araştırmacılar bu çalışmada 240 tıbbi bitki türlerinin yapraklarından etanol ektrelerinin *E. coli* NDM-1'e karşı antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. Bunlar arasında fenolik bileşik olan *Punica granatum* L. (PG) ekstresinin akış sitometrisinde SYTO-9/PI boyasıyla

yaptıkları analizde hücre canlılığının kontrole göre %88,3'den %20'lere düştüğünü analizlemişlerdir.

Camellia sinensis (yeşil çay), yapraklarının antibakteriyel ve antiviral etkileri vardır. Bu bitkide bulunan Epigallokateşin-3- gallat (EGCG) en çok bulunan kateşindir ve bu etkilere katkıda bulunur. EGCG'nin stabilitesinden dolayı, lipofilik bazlı molekül olan Epigallokateşin Gallat-Stearat (EGCG-S) modifiye edilmiştir (Aponte, 2018). Aynı araştırmacı yapmış olduğu tez çalışmasında bu modifiye bileşiğin 250 µg/mL konsantrasyonunu *S. aureus* ve *E. faecalis* bakterilerine 24 saat uyguladığı çalışmada sadece SYTO-9 boyasını kullanarak floresans mikroskobunda elde ettiği görüntülerde bakterilerin öldüğünü tespit etmiştir.

Tez kapsamında yaptığımız bu çalışma, diğer çalışmalarda olduğu gibi polifenollerin bakteriler üzerindeki etkinliğinin araştırılmasında kullanılan SYTO-9/PI boyasıyla boyanan yöntemle paralellik göstermektedir. Sonuç olarak kontrole göre hücre canlılığı tüm çalışmalarda azalmış, apoptotik hücre ölümünde ise konsantrasyonlar düştükçe artmıştır.

4.1.2. Biyofilm oluşum sonuçlarının değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan bakterilerin biyofilm oluşturmaları için belirlenen mikropilaka yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Uygulanan yöntemin ardından biyofilm oluşturan bakteriler kristal viyole ile boyanarak ELISA'da, 570 nm'de okunan dansite değerlerine göre biyofilm oluşumu güçlü, orta, zayıf ve negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3.). Bir bakterinin Güçlü (+++), zayıf (+) ve orta (++) biyofilm derecelendirilmesi optik dansite (O_D) değerlerinin ortalamaları alınarak hesaplanır. O_{DC} değeri, steril besiyeri ortalaması ve standart sapma değeridir. Eğer O_D değeri $\leq O_{DC}$ ise bakteri biyofilm üretmedi; $O_{DC} < O_D \leq 2 \times O_{DC}$ ise bakteri zayıf biyofilm oluşturdu; $2 \times O_{DC} < O_D \leq 4 \times O_{DC}$ ise bakteri orta biyofilm oluşturdu; $4 \times O_{DC} < O_D$ ise bakteri güçlü biyofilm oluşturdu şeklinde yorumlanarak bakterilerin derecelendirilmesi hesaplanmıştır (Stepanovic vd., 2007).

Çizelge 4.3. Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi

570 nm (48 saat) Bakteriler ve steril besiyeri	Kristal viyole ile boyanan biyofilmin mikroplaka üzerindeki görseli	Biyofilm oluşturma ortalamaları O _D Değerleri (Optik dansite değerleri)	Biyofilm oluşturma anlamları
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		2,997	Güçlü biyofilm (+++)
<i>Staphylococcus aureus</i>		0,846	Güçlü biyofilm (+++)
<i>Enterococcus faecalis</i>		0,501	Orta biyofilm (++)
<i>Escherichia coli</i>		0,686	Orta biyofilm (++)
Steril besiyeri		0,196	-

Çalışmamızdaki *E. coli*, *P.aeruginosa*, *S. aureus* ve *E. faecalis*’e karşı biyofilm oluşumları sırasıyla orta (++) , güçlü (+++), güçlü (+++) ve orta (++) şeklinde değerlendirilmiştir.

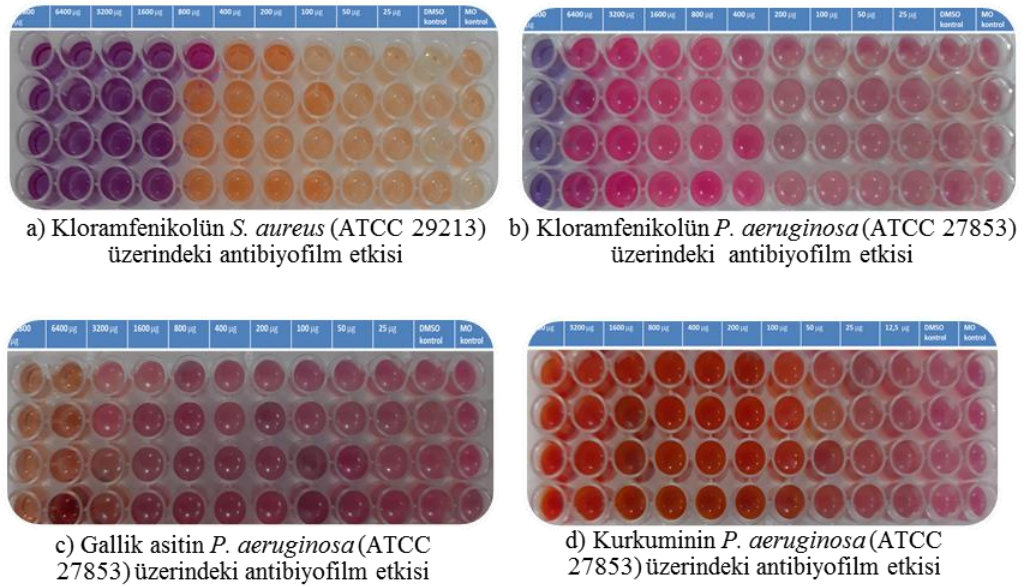
Borges ve diğerleri (2012), *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* bakterilerinin biyofilm oluşum yeteneklerini, Stepenovic ve diğerlerinin (2007) sınıflandırmasına göre, sırasıyla orta (++) , zayıf (+), güçlü (+++) olarak analiz etmişlerdir. Jarda ve arkadaşları (2017), *P. aeruginosa* ATCC (27853) ve *S. aureus* bakterilerinin biyofilm oluşum yeteneklerini sırasıyla orta (++) ve zayıf (+) şeklinde analizlemişlerdir. Hassan ve diğerleri (2011), *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* ve *E. faecalis* bakterilerinin biyofilm oluşum yeteneklerini güçlü (+++), orta (++) , güçlü (+++) ve orta (++) şeklinde analiz etmişlerdir. Yapılan bu çalışmalar, bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Paralel olmayan verilerin ise; suş farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

4.1.3. Antibiyofilm sonuçlarının değerlendirilmesi

Bakterilerin antibiyofilm etkinliği, resazürin ile boyanan MBEK yöntemi ve SYTO-9/PI boyama yöntemi ile hücre canlılığı ölçülerek değerlendirilmiştir.

4.1.3.1. MBEK yöntemiyle antibiyofilin etkinliğinin değeriendirilmesi

Polifenollerin antibiyofilin aktivitesi, Minimum Biyofilin Eradikasyon Konsantrasyonu (MBEK) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Uygulanan yöntemin ardından mikropalakadaki bakterilerin antibiyofilin etkisi resazurin boyasıyla boyanarak hücrelerin canlılığı değeriendirilmiştir. Resazurinle boyanan kuyucuklar, bakterilerin canlılıklarına göre inkübasyondan sonra renk değeriştirirler. Mavi kuyucuklar bakteriyel gelişmenin olmadığını yani bakterilerin canlı olmadığını, pembe-kırmızı kuyucuklar ise gelişmenin olduğunu göstermektedir. İlk pembe-kırmızı kuyucuktan önceki mavi kuyucuk polifenol bileşige ait MBEK olduğunu göstermektedir. Buna göre antibiyofilin sonuçlarının değeriendirilmesi Çizelge 4.4.'de verilmiştir. Görsel 4.5.'deki görüntüler örnek niteliğindedir.



Görsel 4.5. Antibiyofilin sonuçlarının makroskopik görüntüleri

Çizelge 4.4. Polifenollerin bakteriler üzerindeki antibiyofilm etkileri

Bakteriler	Kloramfenikol	Gallik asit	Resveratrol	Kurkumin
<i>E. coli</i>	>1000 µM	>1000 µM	>1000 µM	>1000 µM
<i>P. aeruginosa</i>	>1000 µM	>1000 µM	>1000 µM	250 µM
<i>S. aureus</i>	1000 µM	>1000 µM	>1000 µM	>1000 µM
<i>E. faecalis</i>	>1000 µM	>1000 µM	>1000 µM	>1000 µM

MBEK yöntemiyle belirlenen antibiyofilm sonuçlarında kloramfenikolün *S. aureus* üzerindeki MBEK değeri 1000 µM; diğer kullanılan bakteriler üzerindeki MBEK değeri >1000 µM'dır. Gallik asit ve resveratrolun çalışmada kullanılan tüm bakterilerdeki MBEK değeri >1000 µM'dır. Kurkuminin *P. aeruginosa* üzerindeki MBEK değeri 250 µM; diğer kullanılan bakteriler üzerindeki MBEK değeri >1000 µM'dır.

Liu ve diğerleri (2017), gallik asitin *S. aureus*'a karşı MBEK konsantrasyon değerini 32000 µg/mL olarak bulmuşlardır. Luis ve diğerleri (2014), gallik asitin *S. aureus*'a karşı biyofilm oluşumunu pozitif kontrole göre % 40 azalttığını 4000 µg/mL konsantrasyonunda analiz etmişlerdir. Borges ve diğerleri (2012), gallik asitin biyofilm oluşumunu engellediğini ve biyofilm canlılığını azalttığı için yani bakteriyel hareketliliği durdurduğu için yüksek etki gösterdiğini bulmuşlardır. Borges ve diğerleri (2014), aynı zamanda gallik asitin *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'a karşı biyofilm etkinliğinin önlenmesinde yüksek potansiyel analiz etmişlerdir. Shao ve diğerleri (2015), gallik asitin *E. coli* üzerindeki biyofilm oluşumunu 8000 µg/mL olarak bulmuşlardır.

Sumitkumar ve diğerleri (2009), fenol ve doğal fenolik bileşiklerin, tokoferol ve etil linoleat hariç, *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan biyofilmden anlamlı bir azalma olduğunu göstermişlerdir.

Lee ve diğerleri (2013), resveratrolun oligomerlerinden olan stilbenoid tetramerin *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini bulmuşlardır. *E. coli* üzerindeki 5 µg/mL konsantrasyonu, %90'dan fazlasını inhibe ettiği için daha etkili bulmuşlardır. Cho ve diğerleri (2015), kırmızı şarap içindeki resveratrolun *S. aureus*'a karşı antibiyobilm etkisini analiz etmişlerdir. Kolouchova ve diğerleri (2018), resveratrolun *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı MBEK değerini ise >170 ve 125 µg/mL olarak bulmuşlardır.

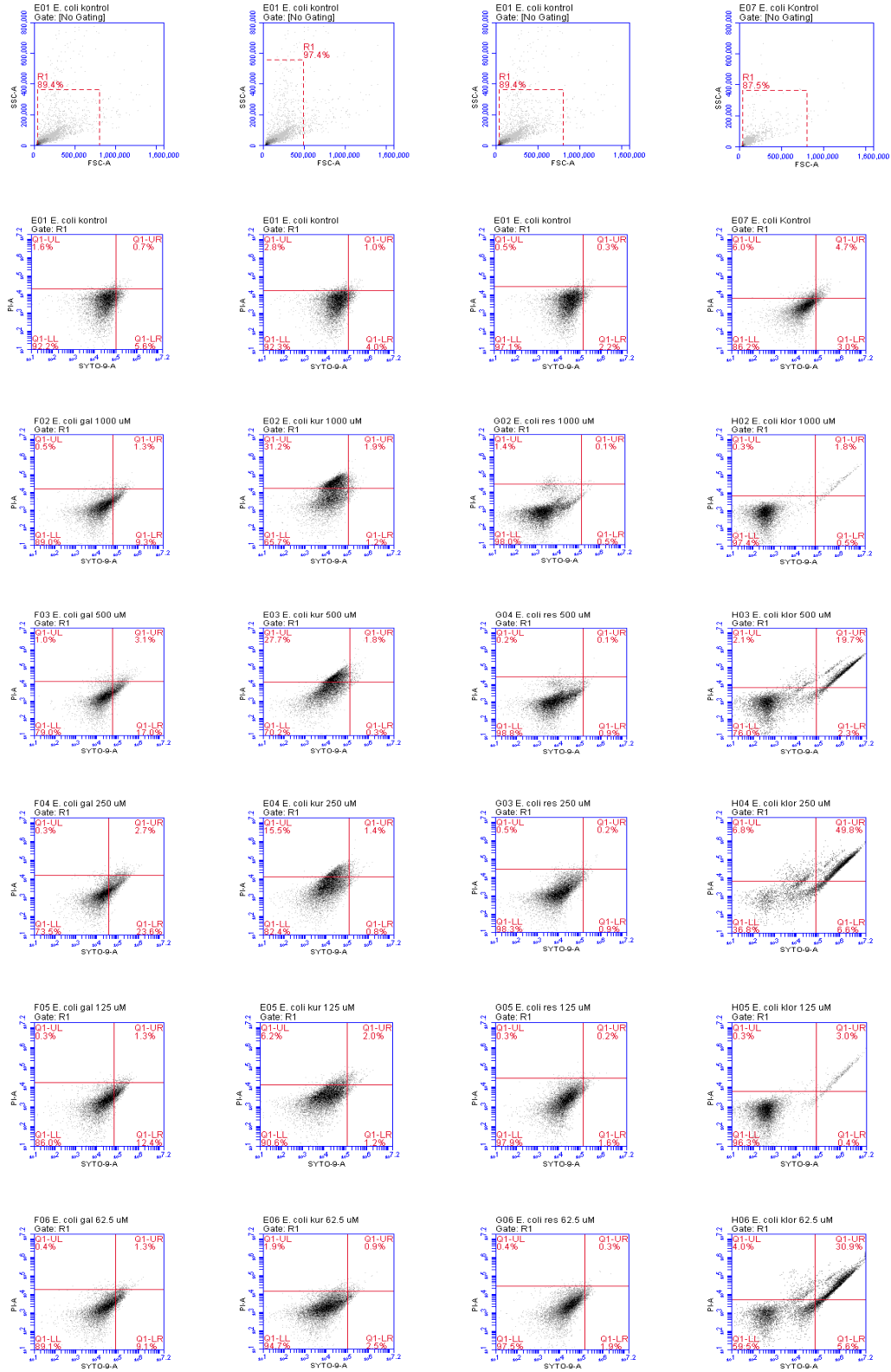
Pravin ve diğerkleri (2016), kurkuminin güçlü bir biyoaktif madde olduğunu, ek olarak antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerine sahip olduğunu vurgulayarak, tüm bu patojenik bakteriyel izolatlarda kurkuminin MBK değeri 128 µg/mL olarak bulmuşlardır. Karaman ve diğerkleri (2013), kurkuminin *P. aeruginosa* biyofilminin tedavisinde kurkumin kullanımı için tatmin edici verileri sağlamak amacıyla daha kapsamlı çalışmalar gerektiğini vurgulamışlardır.

Antibiyofilm üzerine literatürde yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda kullanılan yöntem, bizimde temel bir çalışma olması açısından kullandığımız MBK belirleme yöntemidir. Çalışmamızda akış hücremetrenin mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılabilirliğine önemli bir örnek sunmak ve elde edilen verileri arttırabilmek için SYTO9/PI boya larını kullanarak, canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzde oranları akış hücremetrede çalışılmış, elde edilen veriler Çizelge 4.5.'de sunulmuştur.

4.1.3.2. SYTO-9/PI ile belirlenen biyofilmd e canlı ve ölü hücrelerin değ erlendirilmesi

Polifenollerin bakterilere karşı antibiyofilm etkinliği, SYTO-9/PI boyasıyla da değ erlendirilmiştir. Çalışmada kullandığımız dört bakterinin de antibiyofilm etkinliği akış sitometrisinde incelenmiştir.

In vitro ko kültür modelinde *E. coli* LPS kullanıldığı için hücre kültürüyle paralellik sağlaması açısından polifenollerin *E. coli* bakterisi üzerinde etkinliği incelenmiştir (Şekil 4.2.). Polifenollerin *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *E. faecalis* üzerindeki antibiyofilm etkinlikleri sırasıyla EK-4, EK-5 ve EK-6 şeklinde verilmiştir. Aynı zamanda bu yöntem e göre tüm polifenollerin, tüm bakteriler üzerindeki antibiyofilm değ erlendirilmesi ise Çizelge 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Polifenollerin *E. coli* biyofilmi üzerindeki etkisinin, canlı ve ölü hücre olarak akış sitometride değerlendirilmesi

Çizelge 4.5. Polifenollerin biyofilm üzerindeki etkisinin, canlı ve ölü hücre olarak akış sitometride değerlendirilmesi

Mikroorganizmalar	Polifenoller	Sonuç anlamları	Kontrol	1000 μM	500 μM	250 μM	125 μM	62,5 μM
<i>E. coli</i>	Gallik asit	% Apoptotik h.	6,3	10,6	20,1	26,3	13,7	10,4
		% Nekroz h.	1,6	0,5	1	0,3	0,3	0,4
		% Canlı hücre	92,2	89	79	73,5	86	89,1
	Kurkumin	% Apoptotik h.	5	3,2	2,1	2,2	3,2	3,4
		% Nekroz h.	2,8	31,2	27,7	15,5	6,2	1,9
		% Canlı hücre	92,3	65,7	70,2	82,4	90,6	94,7
	Resveratrol	% Apoptotik h.	2,5	0,6	1	1,1	1,8	2,2
		% Nekroz h.	0,5	1,4	0,2	0,5	0,3	0,4
		% Canlı hücre	97,1	98	98,8	98,3	97,9	97,5
	Kloramfenikol	% Apoptotik h.	7,7	2,3	22	56,4	3,4	36,5
		% Nekroz h.	6	0,3	2,1	6,8	0,3	4
		% Canlı hücre	86,2	97,4	76	36,8	96,3	59,5
<i>P. aeruginosa</i>	Gallik asit	% Apoptotik h.	8,1	23,6	30,1	22,1	35,3	32,8
		% Nekroz h.	0,6	4,1	1,3	9,1	9	2,5
		% Canlı hücre	91,3	72,3	68,7	68,8	55,7	64,8
	Kurkumin	% Apoptotik h.	7,4	34	15,3	19,1	17,4	23,9
		% Nekroz h.	1,1	13,5	20,5	21	21,3	12,8
		% Canlı hücre	91,5	52,5	64,2	60	61,3	63,4
	Resveratrol	% Apoptotik h.	8,1	13,5	21,5	27,8	19,5	29,2
		% Nekroz h.	0,6	6,3	28,4	16,1	21,2	6,4
		% Canlı hücre	91,3	80,1	50,1	56	59,3	64,4
	Kloramfenikol	% Apoptotik h.	9,2	40,9	49,6	79,3	53,1	27,2
		% Nekroz h.	1,7	19,3	24,2	5,9	8,1	9,5
		% Canlı hücre	89,1	39,9	26,2	14,8	38,8	63,4
<i>E. faecalis</i>	Gallik asit	% Apoptotik h.	5,1	9,6	11,4	12	17,7	16,4
		% Nekroz h.	2	2,9	0,9	1,2	1,5	1
		% Canlı hücre	92,9	87,5	87,6	86,8	80,9	82,6
	Kurkumin	% Apoptotik h.	7,6	0,5	2,9	2,6	3,3	2,4
		% Nekroz h.	3,2	21	31,3	51	57,6	50,5
		% Canlı hücre	89,2	78,4	65,8	46,4	39,1	47,1
	Resveratrol	% Apoptotik h.	5,4	0,6	1,9	8,5	9,7	12,2
		% Nekroz h.	2,2	0,8	1,7	1,3	1,1	1,8
		% Canlı hücre	92,3	98,7	96,4	90,2	89,1	86
	Kloramfenikol	% Apoptotik h.	6,8	31,7	45,7	13,3	27,7	2,8
		% Nekroz h.	16	7,5	6	10,2	18,2	19,7
		% Canlı hücre	77,5	60,9	48,3	76,4	54,2	77,5
<i>S. aureus</i>	Gallik asit	% Apoptotik h.	0,2	3,1	3,3	3,6	4,3	7,1
		% Nekroz h.	0,5	5	7,4	16,2	16,3	14,9
		% Canlı hücre	99,2	92	89,4	80,1	79,4	78
	Kurkumin	% Apoptotik h.	0,8	8	7,3	9,3	4,7	3,5
		% Nekroz h.	4,9	16,4	10,7	6,6	22,9	3,7
		% Canlı hücre	94,3	75,6	82,1	84,1	72,4	92,8
	Resveratrol	% Apoptotik h.	4,6	0,1	1,2	1,5	1,3	0,8
		% Nekroz h.	1,7	3,8	14,1	18	12	12
		% Canlı hücre	93,6	96,1	84,6	80,5	86,7	87,2
	Kloramfenikol	% Apoptotik h.	0,2	0,3	1,2	0,8	1,8	2,6
		% Nekroz h.	0,4	3,5	4,3	0,1	15,	0,8
		% Canlı hücre	99,4	96,2	94,5	99,1	83,2	96,6

Yapmış olduğumuz SYTO-9/PI ile boyanan antibiyofilm çalışmasında, gallik asitin 1000, 500, 250, 125 ve 62,5 μM konsantrasyonlarında, *E. coli* üzerindeki canlı hücre oranı sırasıyla %89, %79, %73,5, %86 ve %89,1; *E. faecalis* üzerinde %87,5, %87,6, %86,8 %80,9 ve %82,6; *P. aeruginosa* üzerinde %72,3 %68,7, %68,8, %55,7, %64,8; *S. aureus* üzerinde %92, %89,4, %80,1, %79,4 ve %78 şeklinde bulunmuştur. Aynı zamanda gallik asitin 1000, 500, 250, 125 ve 62,5 μM konsantrasyonlarında, *E.*

coli üzerindeki apoptotik hücre ölümü oranı sırasıyla %10,6; %20,1; %26,3; %13,7 ve %10,4; *E. faecalis* üzerinde %9,6, %11,4, %12, %17,7 ve %16,4; *P. aeruginosa* üzerinde %23,6, %30,1, %22,1, %35,3, %32,8; *S. aureus* üzerinde %3,1, %3,3, %3,6, %4,3, %7,1 şeklinde bulunmuştur.

Kalanchoe blossfeldian bitkisinin fitokimyasal analiziyle gallik asit ve diğer bazı polifenollerin varlığı ortaya çıkmıştır (Pryce, 1972). Bu yüzden Sarkar ve diğerleri (2015), bu bitkinin ekstresinin konfokal lazer tarama mikroskopunda (KLSM), SYTO-9 ve PI boyasıyla boyanan *P. aeruginosa* üzerindeki antibiyofilm etkinliğini incelemişlerdir. Araştırmacılar bu bitkinin antibiyofilm etkisini kontrole göre kıyaslayarak canlılığın azalmış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada KLSM’de incelenen görüntüde, yeşil floresansının turuncuya geçmesi canlılığın azalmış olduğunu göstermektedir.

Çin tıbbi bitkisi olan *Galla chinensis* toksik olmamakla birlikte antibakteriyel ajan olarak da düşünülmektedir. Bu bitkinin ekstresi ve bileşikleri aynı zamanda gallik asit ve türevleri bakımından zengindir ve antimikrobiyal özelliğe sahiptir (Chen vd., 2006; Djakpo ve Yao, 2010). Wu ve diğerleri (2019), *Galla chinensis* ekstresi ile yaptıkları çalışmada *S. aureus*’a karşı MİK değerini 15-31 µg/mL olarak analiz etmişlerdir ve KLSM’de inceledikleri görüntüde, *S. aureus* üzerindeki antibiyofilm etkinliğini kontrole göre azalmış olduğunu tespit etmişlerdir.

Gıda ile temas eden yüzeylerde *S. aureus* biyofilm oluşumu, besin kontaminasyonunun ana nedenidir. Bitkilerde en yaygın metabolitlerden biri olan organik asitler birçok ülkede gıda kaynaklı patojenlerin kontaminasyonunu azaltmak için rutin olarak kullanılmaktadır (Theron ve Lues, 2007). Gallik asit gibi organik asitlerin *S. aureus* biyofilm oluşumuna karşı inhibitör etkisi vardır. Bu nedenle Bai ve diğerleri (2019), organik asit olan kuinik asitin antibiyofilmi etkinliğini araştırmışlardır. Araştırmacılar, KLSM’de görüntüledikleri kuinik asitin 1250 µg/mL konsantrasyonunda *S. aureus* ATCC (29213) üzerindeki biyofilm oluşumunu azaltmış olduğunu tespit etmişlerdir. Bunu SYTO-9 ve PI boyalarını kullanarak inceledikleri canlılığın yeşilden kırmızıya geçerek azalmış olduğunu göstermişlerdir.

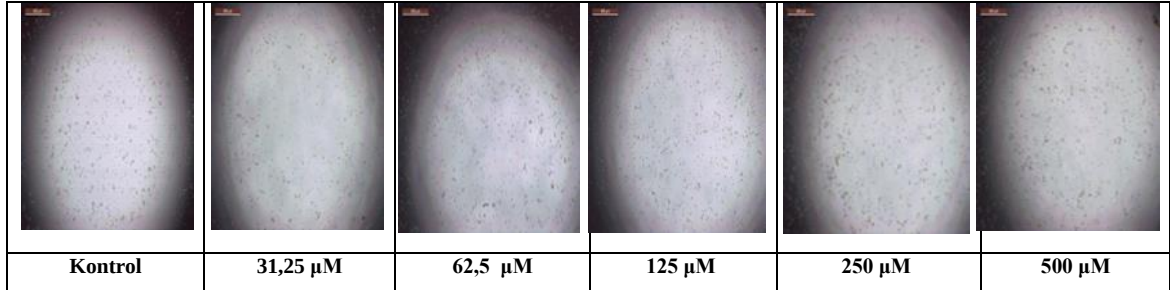
Jadaun ve diğerleri (2015), yapmış oldukları çalışmada kurkumin ve bal (ChC) ikilisini birleştirerek *P. aeruginosa* üzerinde virulans faktörlerini ve antibiyofilm etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, KLSM’de inceledikleri görüntülerde ChC’nin kontrole göre %50 canlılığı azalttığını tespit etmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada SYTO-9/PI ile belirlenen polifenollerin bakteriler üzerindeki antibiyofilm etkinliğinde, hücre canlılığı diğer çalışmalara paralellik göstererek kontrole göre azalmaktadır.

4.2. *İn Vitro* Hücre Kültürü Sonuçları

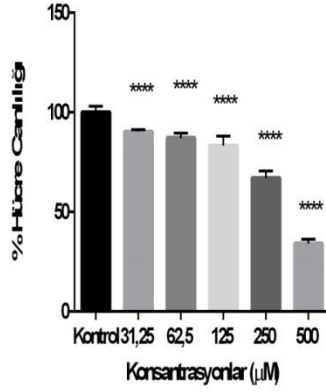
4.2.1. Polifenol bileşiklerin THP-1 Hücresindeki sitotoksik etkilerinin WST-1 yöntemi ile değerlendirilmesi

Öncelikle THP-1 hücrelerinin, 420 nm dalga boyunda ELISA’da okutulan absorbansları, Microsoft Office Excel programına aktarılıp polifenollerin en etkili olduğu konsantrasyonları bulabilmek için % Microsoft Office Excel programından alınan IC₅₀ düzeyleri hesaplanmıştır. IC₅₀ değeri (Inhibitor Concentration), hücrelerin %50'sinin belirli bir sürede öldürüldüğü ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Belirlenen IC₅₀ konsantrasyonları Çizelge 4.6.’da verilmiştir. Daha sonra polifenol ve mesazalin (pozitif kontrol) konsantrasyonlarının Microsoft Office Excel programından alınan % hesapları Graph Pad Software programında % hücre canlılık grafiklerine çevrilmiştir. Bu grafikler Şekil 4.3.’de verilmiştir. Ayrıca hücrelerin mikroskop altındaki görüntüsü Görsel 4.6.’de verilmiştir. (n= tekrar sayısı)

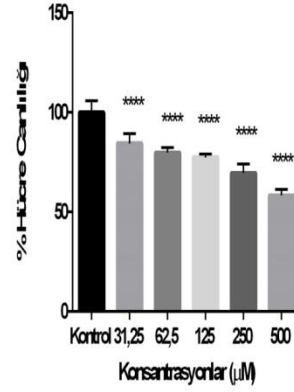


Görsel 4.6. Gallik asitin THP-1 hücreleri üzerindeki belirli konsantrasyonlardaki mikroskop görüntüleri

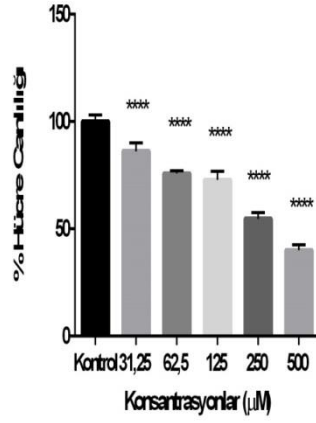
Gallik asitin THP-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi



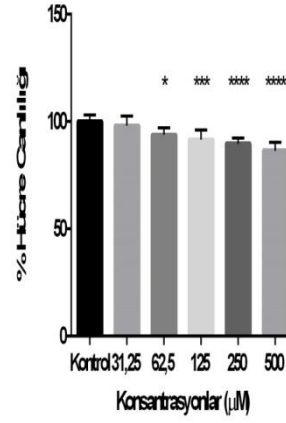
Kurkuminin THP-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi



Resveratrolün THP-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi



Mesalazinin THP-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi



Şekil 4.3. Polifenol ve mesalazin (pozitif kontrol) konsantrasyonlarının, THP-1 hücreleri üzerindeki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (* $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$) ($n=8$)

Çizelge 4.6. THP-1 hücrelerinin IC₅₀ konsantrasyonları

Polifenoller	IC ₅₀
Gallik asit	378 µM
Resveratrol	363 µM
Kurkumin	642 µM
Mesazalin	>500 µM

WST-1 yöntemine göre hesaplanan THP-1 hücrelerinin % canlılık değerleri konsantrasyon artışına bağlı olarak azalmıştır. THP-1 hücrelerinin istatistiksel anlamlılık değerleri kontrol gruplarına göre belirlenmiştir. Gallik asitin, kurkuminin ve resveratrolün, tüm konsantrasyonlarındaki istatistiksel anlamlılık değeri ile mesalazinin 250 ve 500 µM konsantrasyonlarındaki istatistiksel anlamlılık değeri $p < 0,0001$ ****; mesalazinin 125 µM konsantrasyonunda istatistiksel anlamlılık değeri $p < 0,001$ ***, 62,5 µM konsantrasyonunda ise $p < 0.05$ * olarak belirlenmiştir. 31,25 µM konsantrasyonunda ise istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır.

Polifenoller arasından 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glikoz (PGG), prototipik bir gallotannin ve hidrolizlenebilir tanenin biyosentetik yolundaki merkezi bileşiğidir. hidrolizlenebilir tanenler, glikozun gallik asit esterleridir (Zhang vd., 2009). Zhao ve diğerleri (2015), PGG'nin etkisi, THP-1 makrofajında çalıştıkları deneyde, 20-80 µM konsantrasyon aralığında anlamlı bir inhibisyon bulmuşlardır. 0,1-10 µM konsantrasyon aralığında anlamlı bir inhibisyon bulamamışlardır. PGG'nin IC₅₀ değeri ise 60-80 µM arasındadır.

Kim ve diğerleri (2011), kurkumini THP-1 hücreleri üzerinde, pozitif kontrol olarak kullandıkları çalışmada, kurkumin 30 µg/mL (82 µM)'den düşük konsantrasyonda sitotoksiste göstermediğini bulmuşlardır. IC₅₀'sini >82 µM olarak bulmuşlardır.

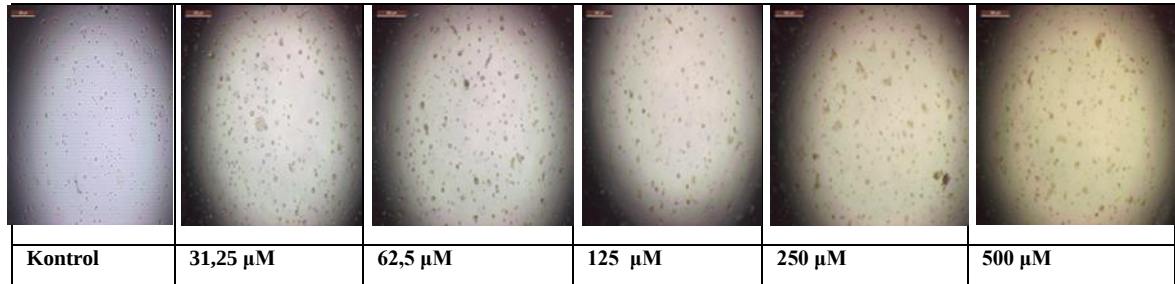
Mahbub ve diğerleri (2013), yapmış oldukları çalışmada, bazı polifenol bileşiklerin IC₅₀ değerlerini THP-1 hücreleri üzerinde şu şekilde vermiştir: quercetin (37), apigenin (180), chrysin (500), rhein (158), emodin (10), aloe-emodin (450), cis stilben (45), trans stilben (380) µM olarak bulmuşlardır.

Dugo ve diğerleri (2017), THP-1 makrofajları üzerindeki yapmış oldukları kakao ekstrakt çalışmasındaki polifenol bileşiklerini sonuçlarını değerlendirirken GAE (Gallik

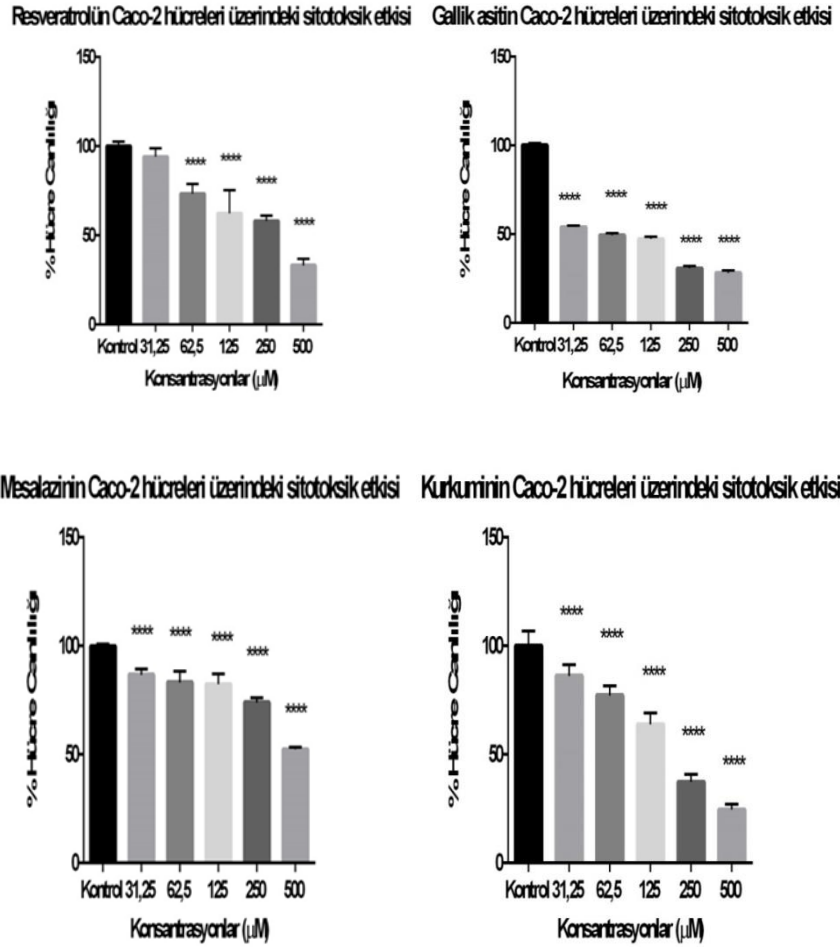
asit eşdeğeri) standardı oluşturarak belirtmişlerdir. GAE'nin 5-100 μM konsantrasyonları arasında anlamlı bir şekilde hücre canlılığı artmıştır. 100 μM konsantrasyonu ile kontrol kıyaslandığında, hücre canlılığı %30 artmıştır. Yani farklılaştırılmış hücrelere karşı, toksik etki göstermediğini belirtmişlerdir.

4.2.2. Polifenol bileşiklerin Caco-2 hücresindeki sitotoksik etkilerinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi

İlk olarak Caco-2 hücrelerinin, 540 nm dalga boyunda ELISA'da okutulan absorbansları, Microsoft Office Excel programına aktarılıp polifenollerin en etkili olduğu konsantrasyonları bulabilmek için % Excel programından alınan IC_{50} düzeyleri hesaplanmıştır. Belirlenen IC_{50} konsantrasyonları Çizelge 4.7. 'de verilmiştir. Ayrıca gallik asitin mikroskop görüntüleri Görsel 4.7.'de verilmiştir. Daha sonra polifenol ve mesalazin (pozitif kontrol) konsantrasyonlarının Microsoft Office Excel programından % hesapları alınarak, Graph Pad Software programında % hücre canlılık grafiklerine çevrilmiştir. Bu grafikler Şekil 4.4.'de verilmiştir.



Görsel 4.7. Gallik asitin Caco-2 hücreleri üzerindeki belirli konsantrasyonlardaki mikroskop görüntüleri



Şekil 4.4. Polifenoller ve mesalazin (pozitif kontrol) konsantrasyonlarının, Caco-2 hücreleri üzerindeki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (**** $p < 0,0001$) ($n=8$)

MTT yöntemine göre hesaplanan Caco-2 hücrelerinin % canlılık değerleri konsantrasyon artışına bağlı olarak önemli derecede azaldığı gözlemlenmiştir. Caco-2 hücrelerinin istatistiksel anlamlılık değerleri kontrol gruplarına göre belirlenmiştir. Gallik asitin, kurkuminin ve mesalazinin tüm konsantrasyonlardaki istatistiksel anlamlılık değeri ile resveratrolün 31,25 μM olan konsantrasyonu hariç diğerlerinin istatistiksel anlamlılık değerleri **** $p < 0,0001$ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. *Caco-2 hücrelerinin IC₅₀ konsantrasyonları*

Polifenoller	IC₅₀
Gallik asit	50 µM
Resveratrol	324 µM
Kurkumin	253 µM
Mesazalin	500 µM

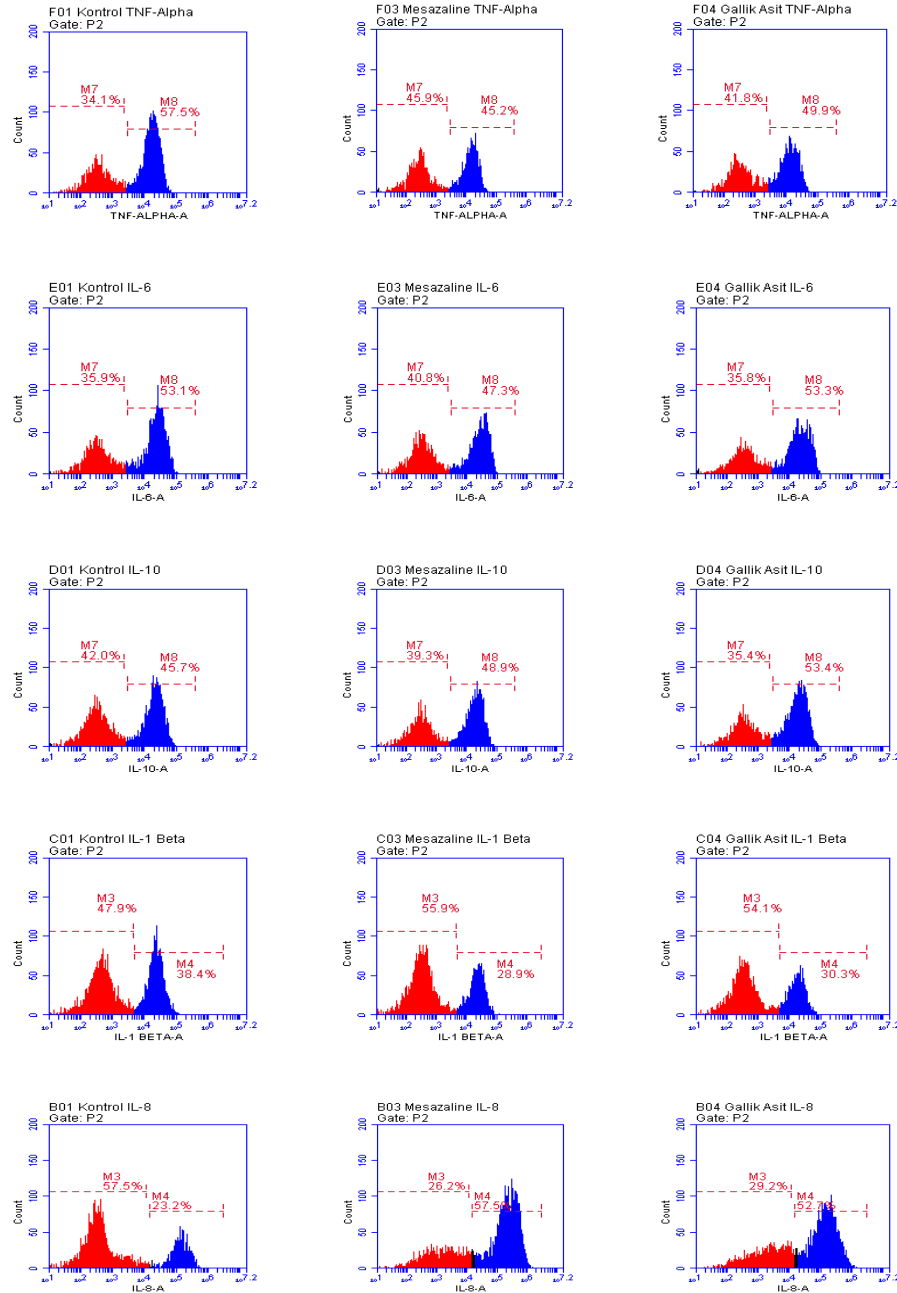
Forester ve Waterhouse (2010), Caco2 hücrelerinde gallik asitin IC₅₀ değerini 68,7 µM olarak analizlemişler ve hücre çoğalmasını da yaptıkları çalışmada etkili bir şekilde azalttığını bulmuşlardır. Forester ve diğerleri (2014), Caco-2 hücrelerinin canlılıklarının azaldığını doza ve zamana bağlı olarak, GA'nın 10-100 µM aralığındaki konsantrasyonlarında bulmuşlardır. Rashidi ve diğerleri (2014), GA'in konsantrasyonlarındaki artışı, Caco-2 hücrelerindeki canlılığı azalmakta olduğunu analizleyerek Caco-2 hücrelerinin anti kanser özelliklerini göstermişlerdir. GA'nın IC₅₀ değerini ise çalışmada 30,5 µg/mL (179 µM) olarak bulmuşlardır. Wang ve diğerleri (2016), Caco-2 hücresinde GA'nın 10 µM konsantrasyonunda, hücre canlılık yüzdesini %89 olarak analizleyerek istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır.

De Maria ve diğerleri (2013), Caco-2 hücrelerindeki reseveratrolun IC₅₀ değerini 156 uM/mL olarak analiz etmişlerdir. Bir başka çalışma, resveratrolün 25 µM konsantrasyonu, Caco-2 hücreleri üzerinde önemli bir antiproliferatif etki göstermiştir. %70 büyümeyi inhibe ettiğini göstermişlerdir (Schneider vd., 2000). Panaro ve diğerleri (2012), Caco-2 üzerinde, resveratrolun 1-100 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığının etkilemediğini bulmuşlardır.

Wahlang, Pawar ve Bansal (2011), Caco-2 hücrelerindeki kurkuminin IC₅₀ değerini 265 µM olarak analiz etmişlerdir. He ve diğerleri (2011), kurkumin tedavisinin, kolorektal kanserli hastaların genel sağlığını iyileştirdiği ve dolayısıyla tümör hücre apoptozunu hızlandırdığı sonucuna varmışlardır. Literatür çalışmalarındaki sonuçlar ile çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar paralellik göstermektedir.

4.2.3. Ko-kültür hücre kültürü modeli ile akış sitometride örneklerin sitokin seviyelerinin değerlendirilmesi

Gallik asit polifenoller arasında IC₅₀ değeri en etkin bileşik olduğu için, ko kültür yöntemiyle gallik asitin ko kültür modelinde pro/antiinmflamatuar sitokinler açısından değerlendirilerek immünolojik etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar kontrol ve mesalazin ile karşılaştırması yapılarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.8.) (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Gallik asitin ko kültür modelinde sitokin seviyelerinin akış sitometride ölçülmesi

Çizelge 4.8. Gallik asitin sitokin sonuçlarının çizelgede gösterilmesi

Örnekler	% (-)	% (+)
Kontrol IL-8	57,5	23,2
Mesalazin IL-8	26,2	57,5
Gallik asit IL-8	29,2	52,7
Kontrol IL- 1 β	47,9	38,4
Mesalazin IL-1 β	55,9	28,9
Gallik asit IL-1 β	54,1	30,3
Kontrol TNF- α	34,1	57,5
Mesalazin TNF- α	45,9	45,2
Gallik asit TNF- α	41,8	49,9
Kontrol IL-10	42	45,7
Mesalazin IL-10	39,3	48,9
Gallik asit IL-10	35,4	53,4
Kontrol IL-6	35,9	53,1
Mesalazin IL-6	40,8	47,3
Gallik asit IL-6	35,8	53,3

THP-1 hücreleri 1 $\mu\text{g/mL}$ *E. coli* LPS ile uyarıldıktan sonra, Caco-2 hücreleri ile ko-kültür hücre kültürü modelinde; IL-8, %23,2 olarak bulunmuş, mesalazin ve gallik asit uygulamasından sonra bu değer sırasıyla %57,5 ve %52,7 olarak ölçülmüştür. IL-1 β , %38,4 olarak bulunmuş mesalazin ve gallik asit uygulamasından sonra bu değer sırasıyla %28,9 ve 30,3 olarak ölçülmüştür. TNF- α %57,5 olarak bulunmuş, mesalazin ve gallik asit uygulamasından sonra bu değer sırasıyla %45,2 ve %49,9 olarak ölçülmüştür. IL-10, %45,7 olarak bulunmuş, mesalazin ve gallik asit uygulamasından sonra bu değer sırasıyla %48,9 ve %53,4 olarak ölçülmüştür. IL-6, %53,1 olarak bulunmuş, mesalazin ve gallik asit uygulamasından sonra bu değer sırasıyla %47,3 ve %53,3 olarak ölçülmüştür. Oransal olarak değerlendirildiğinde Çizelge 4.7.'ye göre gallik asit *E. coli* LPS uygulamasından sonra sadece TNF- α ve IL-1 β seviyelerinde inhibisyon gözlemlenmiştir. 1,15 kat TNF- α ve 1,27 kat IL-1 β seviyeleri üzerinde inhibisyon sağlanmıştır. IL-6, IL-8 ve IL-10 sitokin seviyelerinde artma gözlemlenmiştir. Sitokin seviyelerinde artışın olması, gallik asitin bu sitokinler üzerinde proinflamatuvar etkisi olduğunu göstermektedir.

Bazı çalışmalarda araştırmacılar, proinflatuar sitokin üretimindeki gallik asitin inhibitör etkisindeki konsantrasyonların 10–50 µM aralığında olduğunu göstermişlerdir (Kim vd., 2011; Kim vd., 2006; Choi vd., 2006).

Nile ve diğerleri (2016), yapmış oldukları bir çalışmada *E. coli* LPS ile uyarılmış THP-1 hücreleri üzerinde ferulik asit ile ilgili on tane bileşiğin TNF-α ve IL- 6 seviyelerini belirlemiş ve antiinflatuar aktivitesinin inhibisyon analizini değerlendirmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda gallik asit ile ilgili olarak 10 µM konsantrasyonunda %48 TNF-α inhibisyonu ve %75 IL-6 inhibisyonu gözlemlemişlerdir.

Rupasinghe ve diğerleri (2015), yapmış oldukları bir çalışmada LPS ile indüklenmiş THP-1 hücrelerinde, polifenol ekstraktının proinflatuar sitokinleri kapsayan TNF- α ve IL- 6'yı baskılayabildiklerini analiz etmişlerdir.

Drummond ve diğerleri (2013), yapmış oldukları bir çalışmada bitki ektresinden izole ettikleri polifenol bileşiklerini (apigenin, kuersetin ve salisilik asit), LPS ile stimüle edilmiş THP-1 makrofajlarıyla inkübe etmişler ve IL-1β, TNF-α ve IL-6 seviyelerini ölçmüşlerdir. Yaptıkları çalışmada apigenin ve kuarsetinin 10 µM konsantrasyonunda IL-6 seviyesi anlamlı derecede azalmış, aynı zamanda hem apigenin 10 µM konsantrasyonu hem de kuarsetinin 25 µM konsantrasyonunda TNF-α seviyesi anlamlı derecede azalmıştır. Araştırmacılar, kuarsetinin 50 µM konsantrasyonunda IL-1β, TNF-α ve IL-6 seviyelerini sırasıyla %4, %16 ve %79; apigeninin 50 µM konsantrasyonunda IL-1β, TNF-α ve IL-6 seviyelerini sırasıyla %3, %11 ve %69; salisilik asitin 50 µM konsantrasyonunda IL-1β, TNF-α ve IL-6 seviyelerini ise sırasıyla %36, %100 ve %69 olarak bulmuşlardır.

Liu ve diğerleri (2018), yaptıkları bir çalışmada *Salvia miltiorrhiza f. alba* (Lamiaceae) köklerinden (RSMA) elde edilen ekstreden çeşitli fenolik asitleri izole etmişlerdir. Fenolik asitler, RSMA'nın başlıca etkili bileşenlerindendir. Araştırmacılar bu fenolik asitlerin LPS ile uyarılmış THP-1 hücrelerindeki TNF-α, IL-6 ve IL-1β seviyelerindeki etkilerini araştırmışlar ve tüm fenolik asitlerin 5 ve 25 µM konsantrasyonlarında TNF-α, IL-6 ve IL-1β' yı inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Rathor ve diğerleri (2014), *Ganoderma lucidum*'un hidro-etanolik (HEGL) ekstrenin THP-1 hücrelerindeki TNF-α ve IL-1β'nın *E. coli* LPS ile uyarılmış salınımını anlamlı derecede baskıladığını bulmuşlardır. HEGL'in 25, 50, 100, 250 and 500 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %5,9, %22,5, %42,98, %46,16, %60,18 oranında TNF-

α 'yı inhibe ettiğini bulmuşlardır. Aynı zamanda aynı konsantrasyonlarında yine sırasıyla %28,87, %22,51, %31,25, %35,91 ve %31,61 IL-1 β inhibisyonu gözlemlemişlerdir.

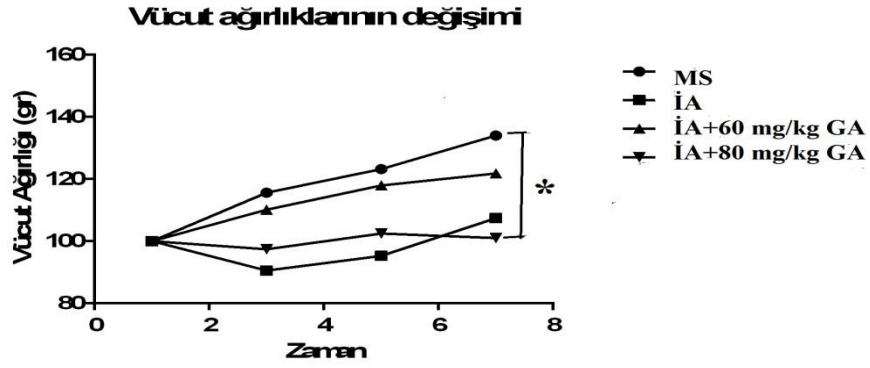
Zhao ve diğerleri (2019), fenolik bileşiklerden olan vanilinin antiinflamatuvar etkinliklerini araştırmışlardır. LPS ile uyarılmış THP-1 hücrelerindeki vanilinin 10, 100 ve 500 μ M konsantrasyonlarındaki IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 ve IL-10 seviyelerinin inhibisyonunu gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar, sonuçları LPS tarafından uyarılmış THP-1 hücrelerinin gelişimini önleyen etkili ve iyi bir antiinflamatuvar özellik gösteren vanilinin iyi bir inhibitör etkisi olduğunu vurgulamaktadır.

Tez kapsamında yapmış olduğumuz bu çalışmamız ko kültür hücre modeli ile akış sitometride ölçülen sitokin seviyeleri, diğer çalışmalarda yapılan LPS ile uyarılmış THP-1 hücrelerinin sitokinlerinin inhibisyonu ile paralellik sağlamaktadır. Literatürlerde gallik asit bileşiğiyle Caco-2 ve THP-1 ko kültür hücre modeli ile sitokin seviyelerinin araştırılması bulunamamıştır. Bu çalışmanın bu kapsamdaki çalışmalara inflamasyonla ilgili sağlık alanındaki gelişmelere ışık tutacağını düşünmekteyiz.

4.3. *In vivo* Çalışmaların Sonuçları

4.3.1. Gallik asidin sıçanlarda İA ile indüklenmiş ülseratif kolit üzerine etkisi

Vücut ağırlığı, İBH patogenezinin yoğun bir klinik belirtisidir. Çalışmada deneyin 1. gününe göre, kontrol grubundaki sıçanların (MS ile tedavi edilen) vücut ağırlığı yaklaşık %34'lük, 60 mg/kg GA ile tedavi edilen sıçanlarda ise %21'lik artış gözlemlenmiştir. Ancak 80 mg/kg GA dozu, İA ile indüklenmiş sıçanlara göre vücut ağırlığı üzerinde çok önemli bir etki yaratmamıştır. İstatistiksel anlamlılık değerleri sadece 7. günde, MS ile İA+GA (80 mg/kg) grupları anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer gün ve gruplar arasında istatistiksel anlamlılık değeri bulunmamıştır (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. İA kaynaklı kolit ile sıçanlarda farklı dozlarda gallik asit uygulamasından sonra 1., 3., 5., ve 7. gündeki vücut ağırlıklarının değişimi. (* $p < 0,05$) (n=5-8)

Pandurangan ve diğerlerinin (2015) dekstran sodyum sülfat (DSS) ile indüklenen kolit modeli çalışmasında; GA uygulanan gruptaki sıçanların vücut ağırlığı, kontrol grubuna kıyasla, azaldığını, DSS ile indüklenmiş kolit modeline kıyasla da arttığını gözlemlemişlerdir.

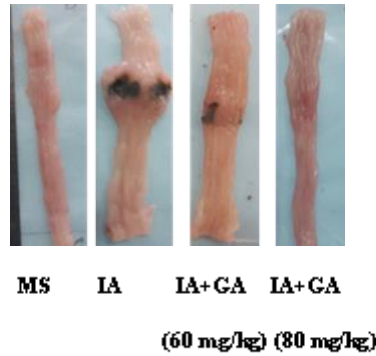
Zhu, Gu ve Shen (2019) farelerde yaptıkları bir çalışmada, kontrol grubundaki farelerin normal diyetle beslendiklerini belirterek vücut ağırlıklarının deney boyunca arttığını bildirmişler. 2,4,6-Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) ile İBH indüklenen gruptaki farelerin vücut kilo alımı kontrol grubuna göre kıyasla oldukça az iken, 60 mg/kg GA ile tedavi edilmiş farelerin kilo alımındaki değişim neredeyse kontrol grubuna yakın ve hasta grubuna kıyasla daha fazla olduğunu bildirmişler. Araştırmacılar; GA'nın ülseratif kolite sahip farelerin vücut ağırlıklarının artışında oldukça önemli bir koruyucu etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Tez kapsamında yapmış olduğumuz bu çalışmamız, diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir. Kontrol grubunda normal diyetle beslenen sıçanların vücut ağırlığı deney süresince artmıştır. Benzer bir şekilde; İA ile indüklenen kolit modelinde, 60 mg/kg dozundaki GA'nın tedavi edici etkinliği ön plana çıkmış ve deney boyunca bu gruptaki sıçanların kilosunda tıpkı kontrol grubunda olduğu gibi artış olduğu analiz edilmiştir. İstatistiksel olarak da incelendiğinde; kontrol grubu ile 60 mg/kg GA uygulanan grup kıyaslandığı zaman aralarında herhangi bir farka rastlanmamıştır. 80 mg/kg GA tedavisi ise önemli bir etki yaratmamış ve hatta hastalığın patogenezinde negatif bir etki ortaya çıkarmıştır. Sonuç olarak özellikle 60 mg/kg GA dozunun, UC

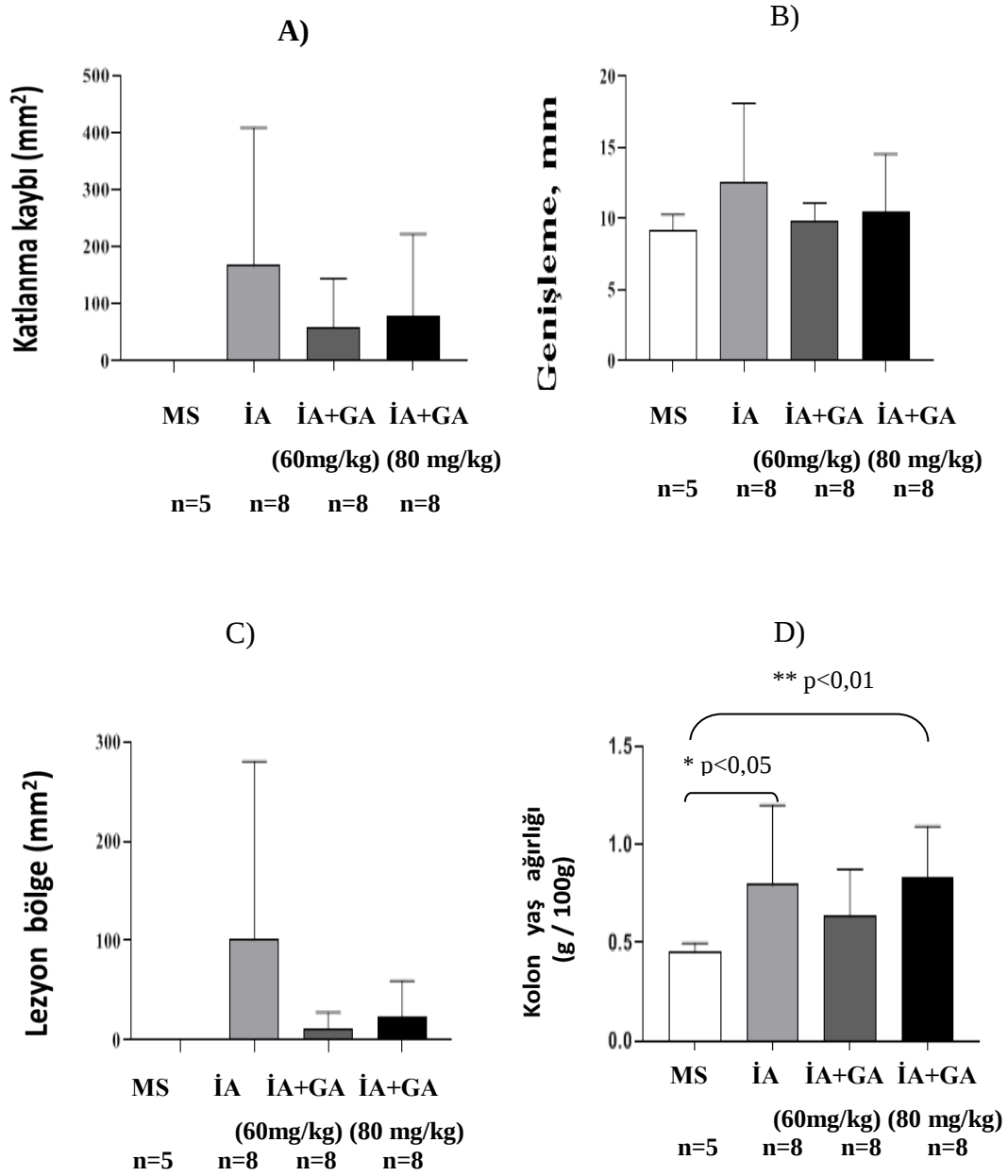
patogenezinin oluşumunu azaltmada önemli bir etken madde olabileceğini düşünmekteyiz.

Bazı kanıtlar, mukozal bağışıklık sisteminin dengesizliğinin, inflamasyona neden olabileceğini net bir şekilde göstermektedir. Kolon mukozasında meydana gelecek bu kronik inflamasyon, ülserasyonlara, ödem ve lezyonların oluşmasına neden olacaktır (Kandhare vd., 2012; Alenazi, 2013).

Yaptığımız çalışmada, kolonik lezyon boyutları, kolonik genişleme ve katlanma kaybı (inflamasyon ve ödem belirteçleri) gibi birtakım parametreler analiz edilmiş ve İA ile indüklenen kolit modeli grubuna karşı GA (60 ve 80 mg/kg) gruplarının doza bağlı olarak bu belirteçlerdeki kötü prognozu azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.7). İstatistiksel açıdan herhangi bir anlamlılık derecesi tespit edilmemiş olmasıyla birlikte grafikler incelendiğinde 60 mg/kg dozda GA uygulanan grubun 80 mg/kg dozda GA uygulanan gruba kıyasla sonuçların kontrol grubuna daha yakın olduğu net bir şekilde görülmektedir. Yine kolon yaş ağırlığı incelendiğinde (Şekil 4.7. D), 60 mg/kg GA uygulanan grupta kontrol grubu ile kıyaslandığında herhangi bir fark bulunmaması bize GA'nın 60 mg/kg dozunun kolit modeli üzerindeki tedavi edici etkinliğini göstermektedir. 80 mg/kg GA dozu incelendiğinde ise İA ile indüklenen kolit grubundaki doku yaş ağırlığından hiç bir farkı yoktur. Bu da bize 80 mg/kg GA dozunun bağırsak dokusu üzerinde herhangi bir tedavi edici etkinliğinin olmadığını göstermektedir. Şekil 4.7. D'de görüldüğü gibi MS ve İA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülürken (* $p < 0,05$); MS ve İA+80 mg/kg GA arasında istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı bir farklılık (** $p < 0,01$) görülmektedir. Görsel 4.8.'de aynı zamanda yaş kolonun gruplara göre kolit oluşturup oluşturmadığının görselleri de bulunmaktadır.



Görsel 4.8. Yaş kolonların kolit oluşturup oluşturmadığının makroskobik görüntüleri



Şekil 4.7. İA kaynaklı kolit modeli ve sıçanlarda Galik asit uygulamasından sonra kolonik mukozada doza bağlı olarak değişen makroskopik sonuçlar. Sonuçlar ortalama + SS olarak ifade edilmiştir. A) Kolonik katlanma kaybı; B) Genişleme; C) Lezyon bölge; D) Kolon yaş ağırlığının kantitatif ölçümü ve istatistiksel değerlendirilmesi (* p<0,05; ** p<0,01)

Pandurangan ve diğerlerinin (2015), DSS ile indükledikleri kolitli farelerde, kontrol grubundaki farelere kıyasla kolon uzunluğunda istatistiksel açıdan anlamlı bir kısalma gözlemlerken; tedavi edici olarak GA uygulanan grupta kolon uzunluğunun

yeniden arttığını ve uzunluğun kontrol grubuna kadar yaklaştığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar 10 mg/kg GA'nın, DSS ile indüklenmiş kolitli farelerin kolit şiddetini ve kolon genişlemesini azalttığını ve aynı zamanda hücresel yaralanma ile ilişkili morfolojik değişikliklerin zayıfladığını, bağırsak mimarisinin iyice korunduğunu ve inflamasyonun önemli bir göstergesi olan hücre infiltrasyonun önemli bir şekilde azaldığını gözlemlemişlerdir.

Khodayar ve diğerlerinin (2018) sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, TNBS ile indüklenmiş İBH sıçan modelinde gallik asitin koruyucu etkilerini değerlendirmişlerdir. Gallik asitin özellikle 100 mg/kg dozu ile makroskopik ve mikroskopik kolon hasarını iyileştirdiklerini belirtmişlerdir.

Zhu, Gu ve Shen (2019) farelerdeki çalışmalarında, kolon dokusunun ağırlığını ve uzunluğunu ölçmüşlerdir. TNBS ile indüklenmiş sıçanlardaki kolonun uzunluğunu, kontrol grubundaki sıçanların kolon uzunluğu ile karşılaştırdıklarında bir kısılmanın olduğunu gözlemlemişlerdir. TNBS ile indüklenmiş grup ile GA (20, 40 ve 60 mg/kg) gruplarındaki sıçanların bağırsakları kıyaslandığında; bağırsak ağırlıklarında ve uzunluklarında doz miktarı arttıkça bir artış ve kontrol grubuna yaklaşıma durumu gözlemlemişlerdir. GA tedavisinin, TNBS ile indüklenmiş kolonik doku hasarına karşı ciddi derecede pozitif yönde artan bir etki göstermiş olduğunu tespit etmişlerdir. Bu yüzden bu verilerin, GA'nın, TNBS ile indüklenmiş kolit modelindeki bağırsak doku deformasyonunu iyileştirmede, önemli bir role sahip olduğunu işaret etmişlerdir. Aynı zamanda araştırmacılar GA'nın TNBS ile indüklenen kolite karşı koruyucu etkilerinin, antiapoptotik etkilerinin de aracılık edebileceğini belirtmişlerdir.

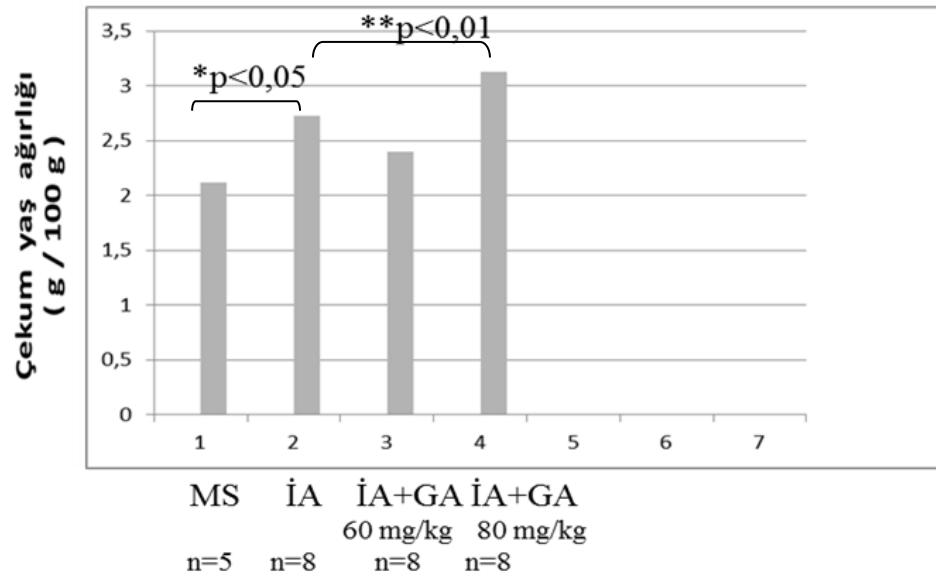
Yapılan diğer çalışmalar da bizim şimdiki çalışmamızı destekler niteliktedir. Kolonun makroskopik olarak değerlendirilmesiyle sonuçlarımızın diğer çalışmalara paralellik gösterdiğini görmekteyiz. Yapılan GA uygulaması, kolon genişliğinde ve İA kaynaklı hücresel yaralanmanın iyileşmesinde önemli bir rol oynamıştır.

4.3.2. İA ile indüklenen kolitli sıçanlarda gallik asidin çekum üzerine etkisinin değerlendirilmesi

Arka bağırsak fermenterleri olarak, kemirgenler ve tavşanlar, sindirime giren yiyeceklerin tutulduğu, mikroplarla karıştırıldığı ve fermente edildiği büyük bir çekum veya kolon içermektedirler (Xiao vd., 2015). Çekumdaki sindirilmeyen materyaller, bağırsak bakterileri için potansiyel bir kaynaktır. Çekal genişlemenin, konvansiyonel

hayvanlarda mikrobiyal fermentasyonla parçalanması gereken maddelerin miktarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, çekum ağırlığındaki değişim, kolondaki fermentasyon sürecinin bozulduğunu gösteren disbiyozun (kalın bağırsakta bakteriyel bozulma) bir işaretidir (Savage ve Dubos, 1968; Tulstrup vd., 2015; Sivaprakasam vd., 2017).

Şekil 4.8.'de görüldüğü gibi, 80 mg/kg dozunda gallik asit ile yapılan tedavi, İA ile indüklenmiş ülseratif kolitli sıçanlara göre çekum yaş ağırlığı artmıştır. 60 mg/kg dozunda gallik asit ile yapılan tedavi, İA ile indüklenmiş ülseratif kolitli sıçanlara göre çekum yaş ağırlığını azaltmıştır. Aynı zamanda, MS ile İA grupları arasında istatistiksel anlamlılık değeri * $p<0,05$; İA ile İA+80 mg/kg GA grupları arasında ise istatistiksel anlamlılık değeri ** $p<0,01$ olarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.8. İA kaynaklı kolitli sıçanlarda galik asit uygulamasından sonra çekumun yaş ağırlığının doza bağlı değişimleri ve istatistiksel değerlendirilmesi (* $p<0,05$; ** $p<0,01$) Sonuçlar ortalama + SS olarak ifade edilmiştir.

Tulstrup ve diğerlerinin (2015), yaptıkları bir çalışmada antibiyotiklerin, bağırsak disbiyoz değişimini incelemişler ve amoksisilin ve vankomisin uygulamasından sonra çekum ağırlığının arttığını göstermişlerdir.

Loesche'nin (1969) yapmış olduğu çalışmada, gnotobiyotik (canlılar üzerinde, mikroorganizmaların bulunmadığı veya sadece bilinen ya da belirtilen mikroorganizmalar ile ilişkili olan organizmalar ya da koşullar) farelerin ve sıçanların çeşitli bakteriyel kontaminasyonlarının çekal büyüklüğü üzerindeki etkisini

araştırmıştır. Karışık ileum bakterilerinin, çekumdaki çözünür protein ve karbonhidrat birikimini önleyerek çekumun büyüklüğünü düşürdüğünü bulmuştur.

Diğer çalışmalardaki sonuçlarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da çekum ağırlığı doza bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. Yani İA ile indüklenmiş çekuma kıyasla 60 mg/kg GA uygulamasında bakteriyel bozulma azalmış, 80 mg/kg GA uygulamasında bakteriyel bozulma artmıştır.

4.3.3. İA ile indüklenen kolitli sıçanlarda gallik asidin vasküler geçirgenliğe etkisi

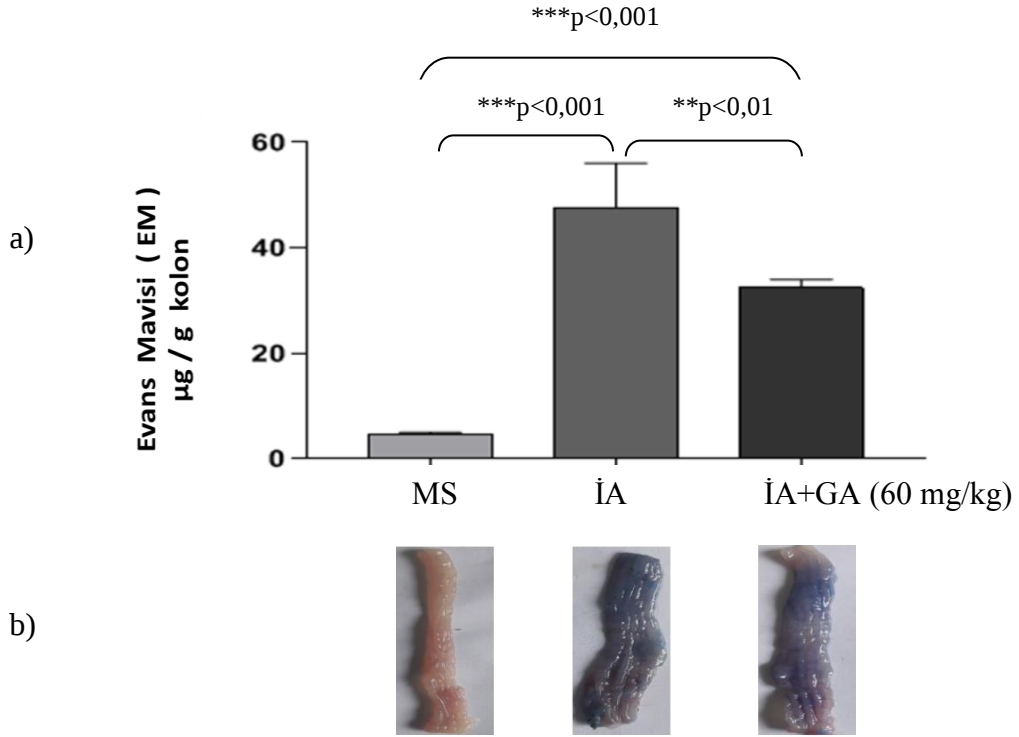
İBH'deki kritik bir etiyolojik faktör, mukus tabakasının bakteri ve bakteri ürünleri için daha geçirgen hale gelmesidir (Bischoff vd., 2014). Bağırsak geçirgenliği sadece epitelden değil, aynı zamanda mikrovasküler endotel bariyerlerden de etkilenmektedir (Sun vd., 1998). Mikrovasküler endotel bariyerinin intestinal homeostazın savunulmasındaki rolü, sıralanan etkenlere rağmen çok bilinmemektedir: 1) kılcal kan akışı, oksijen ve besin iletimi için esastır; 2) dolaşımdaki lökositlerin ve diğer inflamatuvar hücrelerin ve proteinlerin mukozaya ekstrasvazasyonunu (enjeksiyon sırasında kullanılan maddenin damar dışına sızması) önleyen bir “kapı bekçisi” olarak hizmet etmektedir; 3) doğuştan gelen bağışıklık cevapta, proinflamatuvar sitokinlerin sentezi ve salınmasında büyük bir role sahiptir (Sun vd., 1998; Foitzik vd., 1999).

İyodoasetamid ile indüklenen UC gelişimi, iyodoasetamidin intrarektal uygulanmasından 15 dakika sonra kolonik vasküler geçirgenlikteki artış ile başlar ve 1-2 saat sonunda en yüksek etkisi ile kendini gösterir (Tolstanova vd., 2012).

Evans mavisi (EM), canlılığı ayırt etmek için kullanılan bir azo boyasıdır. Aynı zamanda intravasküler hacmi sınırlandıran plazma proteinlerine bağlanan bir boyadır (http 4).

EM lavmanı, İA ve 60 mg/kg GA grubundaki sıçanlara diseksiyondan 30 dakika önce verilmiştir. 60 mg/kg GA uygulaması, İA ile indüklenmiş kolite göre kıyaslandığında damar geçirgenliğini azalttığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, MS ile İA grupları arasında istatistiksel anlamlılık değeri $p<0,001$; İA ile İA+ 60 mg/kg GA grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık değeri $p<0,01$; MS ile İA+ 60 mg/kg GA grupları arasında ise istatistiksel anlamlılık değeri $p<0,001$ olarak analiz edilmiştir [Şekil 4.9. (a)].

Kolonik mukozada, GA uygulamasında EM ekstretrazasyonları belirgin şekilde hafiflemiştir. EM ile muamele edilen mavi alanın büyüklüğü ve yoğunluğu damar geçirgenliği seviyesini temsil etmektedir [Şekil 4.9. (b)].



Şekil 4.9. İA kaynaklı kolitli sıçanlarda Galik asit uygulamasından sonra kolonun permeabilitesinin belirlenmesi ve istatistiksel değerlendirilmesi (** $p<0,01$; *** $p<0,001$). (a) Kolon mukozasında damar dışına çıkmış Evans mavisi ekstraksiyonu ile damar geçirgenliğinin kantitatif ölçümleri. (b) Sıçan kolonunun makroskopik görünüşü. (n=5-8 sıçan)

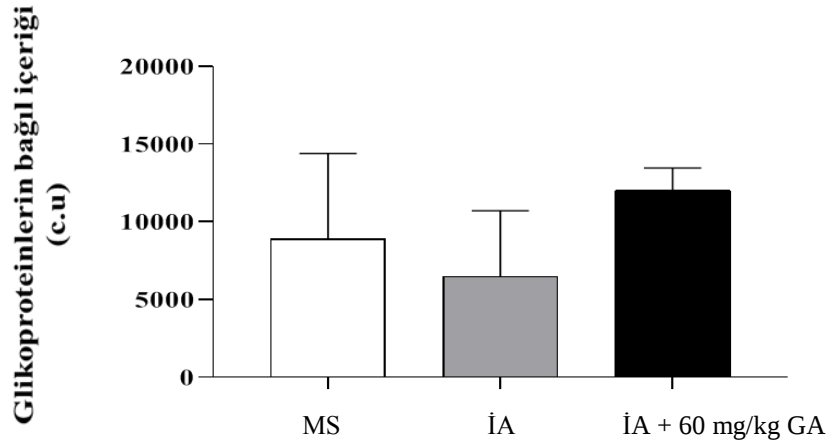
Bağırsak bariyer işlev bozukluğuna bağlı artan bağırsak geçirgenliğinin, çeşitli hastalıklarda düşük dereceli iltihaplanmaya neden olabilen mikrobiyal translokasyona neden olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu olaylar dizisi henüz kapsamlı bir şekilde değerlendirilmemiştir. Fukui'nin (2016) yapmış olduğu çalışmada, bağırsak geçirgenliğinin inflamasyon riskini gerçekten etkilediğini düşünmüyor olmasına rağmen, bağırsak bariyer bütünlüğünün bozulmasının artan bağırsak geçirgenliğine sebep olabileceği ve dolayısı ile inflamatuvar değişikliklere sebep olabileceği yönünde klinik ve deneysel kanıtlar sunmuştur.

Yapmış olduğumuz çalışmada, İA ile indüklenmiş kolitin, GA ile tedavi edilmiş kolite kıyasla EM geçirgenliğinin yoğunluğu ve konsantrasyonunun, daha fazla olduğu

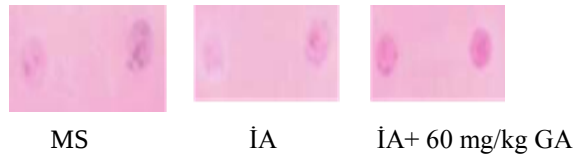
analiz edilmiştir. Sonuçlar bize 60 mg/kg GA uygulamasının, vasküler geçirgenliğin seviyesini düşürdüğünü göstermiştir. Yani, GA'nın iyileştirici etkisinden dolayı, bağırsak bariyer işlev bozukluğu İA ile indüklenen kolite göre daha hafif kalması, inflamasyonun daha az etkinlikte olduğunun bir göstergesidir.

4.3.4. Mukus glikoproteinlerinin periyodik asit/Schiff boyama ile değerlendirilmesi

Çalışmamızda, mukustaki toplam glikan içeriğini tespit eden Schiff reaksiyonu kullanılmıştır. Şekil 4.10.'da, İA ile indüklenmiş kolitli sıçanlarda kolonik mukozadaki mukus seviyesi, kontrol grubuyla (MS) karşılaştırıldığında, 1,3 kat azalma gözlemlenmiştir. 60 mg/kg GA uygulanan sıçanlar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kolon mukozasındaki mukus seviyesi 1,3 kat artma gözlemlenmiştir. Bu değerlendirme de istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır.



Şekil 4.10. İA kaynaklı kolitli sıçanlarda Gallik asit uygulamasından sonra kolonik mukozadaki glikoproteinlerin mukus seviyesinin kantitatif ölçümleri. Sonuçlar ortalama + SS olarak ifade edilmiştir. (n = 5-8 sıçan)



Görsel 4.9. PVDF membranındaki Schiff reaksiyonu ile glikoproteinlerin makroskopik görüntüsü

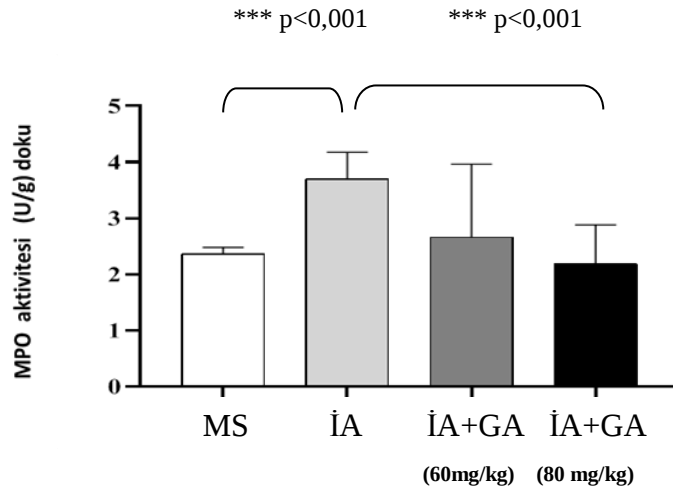
Müsin glikoproteinleri, kolonik mukozal yüzey üzerinde sürekli bir koruyucu bariyer olarak görünen viskoelastik bir jel oluşturmaktadır. Ancak, sağlık ve hastalıktaki yapı ve işlevleri belirsizliğini korumaktadır (Smith ve Podolsky, 1986).

Kolonik iç mukus tabakası canlıyı patojenlerden ve kommensal kaynaklı enflamasyondan korumaktadır ve UC'de hasarlı olduğu bilinmektedir (Van der Post vd., 2019). Bu yüzden UC patogenezindeki potansiyel katkılarını görebilmek için bu çalışma yapılmıştır. Mukus bariyer bileşimindeki değişiklikler sadece toplam glikoprotein sayısındaki düşüşe değil, aynı zamanda glikan çekirdeğinin bozulmasına da bağlıdır. Glikanlar, bakterinin hücre duvarı yapılarından biridir ve müsin molekül kütlelerinin %60-80'ini oluşturur. Glikan çekirdeği müsinlerin protein kısmını korumakta ve bakterilerin kolonik mukozanın epitel hücreleri ile temas etmesini engellemek için mukus bariyerini daha verimli hale getirmektedir. Böylece inflamasyon gelişimini önlemektedir. Yaptığımız çalışmada İA ile indüklenen kolitin kontrole göre azalmasını, glikan çekirdeğinin bozulmasıyla ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

4.3.5. İA ile indüklenen kolitli sıçanlarda gallik asitin MPO aktivitesi üzerine etkisinin değerlendirilmesi

Lökosit infiltrasyonu İBH patojenezinin bir özelliği ve inflamasyon seviyesinin belirtisi olduğundan, gallik asidin MPO aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

İA ile indüklenen kolitli sıçanların bağırsak dokusundaki MPO aktivitesi MS grubu ile kıyaslandığında MPO aktivitesinin istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir şekilde artmış olduğu görülmektedir ($p<0,001$). 60 mg/kg dozdaki GA grubunun, İA grubuna kıyasla MPO aktivitesini önemli ölçüde azaltırken, herhangi bir grupta karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. 80 mg/kg dozundaki gallik asit, İA grubuna kıyasla MPO aktivitesini istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir fark yaratacak şekilde düşürmüştür ($p<0,001$) (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. İA kaynaklı kolitli sıçanlarda Galik asit uygulamasından sonra kolonda MPO aktivitesi. Kolonik dokudaki MPO aktivitesinin kantitatif ölçüm sonuçları ve istatistiksel değerlendirilmesi (*** $p<0,0001$). Sonuçlar ortalama + SS olarak ifade edilmiştir. (n=5-8 sıçan)

Pandurangan ve diğerlerinin (2015), farelerde yapmış oldukları çalışmada, DSS ile indüklenen kolit modellerinde, GA'nın, DSS grubuna kıyasla, MPO aktivitesinin önemli derecede düşmesine neden olduğunu göstermişlerdir. Yine başka bir çalışmada; Khodayar ve diğerleri (2018), doza bağlı GA'nın MPO aktivitesini baskıladığını göstermişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmalarında; farklı grupların kolon dokusunun MPO aktivitesindeki değişiklikleri analiz ederek, gallik asitin *in vivo* antiinflamatuvar etkilerinin varlığını kanıtlamışlardır. TNBS ile indüklenen gruptaki sıçanların bağırsak dokusundaki MPO aktivitesi, kontrol grubundan istatistiksel açıdan anlamlı olarak çok daha yüksekti ($p<0,001$) ve farklı (25, 50, 75, 100 mg/kg) gallik asit konsantrasyonlarının kullanıldığı çalışmada 100 mg/kg'lık olan dozun, kolon hasarını azaltmada en etkili doz ($p<0,001$) olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, gallik asit uygulamasının, MPO aktivitesi üzerinde doza bağlı olarak anlamlı ölçüde azalma olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Bu veriler daha önce Pandurangan ve diğerlerinin (2015) çalışmasında da doğrulanmıştır. Rosso ve diğerleri (2006), gallik asidin ve türevlerinin MPO aktivitesini önemli ölçüde engellediğini göstermiştir.

Bizim çalışmamızda yapmış olduğumuz MPO aktivitesi analizi diğer çalışmalara paralellik göstermiştir ve GA kolon dokusunun inflamasyonunu engellemiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatürlerde, doğal bileşiklerin antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve antitümoral gibi birçok etkinlikleri hakkında kapsamlı birçok araştırma yapılmıştır. Bu çalışma gallik asit, kurkumin ve resveratrol gibi bazı doğal bileşiklerin hem bağırsak mikrobiyotasında yaşayan hem de patojen olarak bilinen *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* ve *E. coli* bakterileri üzerinde çeşitli yöntemler kullanılarak antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerini araştırmak ve bu doğal bileşiklerin Caco-2 insan kolon kanseri ve THP-1 insan monosit hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkilerini değerlendirmek amacıyla planlanmıştır. Çalışmada bakteriler için pozitif kontrol olarak kloramfenikol; hücre hatları için mesalazin kullanılmıştır. Aynı zamanda gallik asit *in vitro* kokültür modelinde pro/antiinflamatuvar sitokinler açısından değerlendirilerek immünolojik etkileri araştırılmış ve *in vivo* ülseratif kolit oluşturulmuş sıçanlarda etkileri değerlendirilmiştir.

Tez kapsamında yapılan antibakteriyel ve antibiyofilm çalışmasında konsantrasyon artışına bağlı olarak gallik asit, kurkumin ve resveratrolun *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* ve *E. coli* bakterilerine karşı hücre proliferasyonunu azalttığı gözlemlenmiştir. Farklı yöntemler kullanılarak karşılaştırılması amaçlanan bu çalışma, özellikle mikrobiyoloji alanında akış sitometri kullanımına önemli bir örnek oluşturmaktadır.

Caco-2 ve THP-1 hücreleri üzerinde gallik asit, kurkumin ve resveratrolun konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre proliferasyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı gözlemlenmiştir. Özellikle Caco-2 hücresinde gallik asitin diğer doğal bileşiklere göre IC₅₀ dozunun 50 µM olduğu bulunmuştur.

Yapılan bu araştırmalar doğrultusunda *in vitro* ko kültür modelinde inflamasyon oluşturmak için *E. coli* LPS kullanılmıştır. *E. coli* normal bağırsak florasının baskın türü olduğu ve aynı zamanda bağırsak enfeksiyonunu oluşturan bakteriler arasında olduğu için tercih edilmiştir. Çalışmada THP-1 monosit hücrelerinin *E. coli* LPS ile uyarılarak inflamasyon oluşturulduktan sonra 50 µM gallik asit, *in vitro* olarak oluşturulmuş THP-1 ve Caco-2 ko kültür modelinde pro/antiinflamatuvar sitokinleri açısından immünolojik olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda TNF-α ve IL-1β seviyelerinde inhibisyon olduğu gözlemlenmiştir. IL-6, IL-8 ve IL-10 sitokin seviyelerinde artma gözlemlenmiştir. Sitokin seviyelerinde artışın olması, gallik asitin bu sitokinler üzerinde

proinflatuar etkisi olduğunu göstermektedir. İmmunolojik değerlendirme sonucunda, gallik asit hem antiinflatuar hem de proinflatuar bir etki göstermektedir.

Tez çalışmasının *in vivo* kısmında gallik asitin ülseratif kolit oluşturulmuş sıçanlarda, vücut ağırlıkları, kolonun klinik ve makroskobik değerlendirmeleri, vasküler geçirgenliği ve MPO aktivitesi araştırılmıştır. Sonuç olarak sıçanlardaki ülseratif kolit modelinde, gallik asitin 60 mg/kg dozunun iyileştirici etkileri gözlemlenmiştir. Ayrıca gallik asit patogenezi oluşumunu azaltmada önemli bir etken madde olmuştur.

Bu tez, amacı ve bulguları doğrultusunda literatürdeki bulgulara paralellik göstererek önemli sonuçlar elde etmiştir. Ayrıca literatürlerde, bu tez kapsamında, kapsamlı bir mikrobiyolojik, *in vitro* ve *invivo* alışmalarına rastlanılmamıştır.

Biyofilm ile ilgili bu tez kapsamında yapılan çalışmalar değişkenlik göstermesinden dolayı daha fazla araştırmanın yapılması gerektiğini, özellikle QS inhibe edici özellikte bileşiklerin keşfedilmesi gerektiğini bu nedenle de QS mekanizması üzerinde ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca bu tezin, biyofilm oluşumunun inhibe edilmesi ve biyofilm kökenli enfeksiyonların durdurulmasıyla ilgili yapılacak olan çalışmalara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKÇA

Abreu, M.T. ve Peek, R.M. (2014). Gastrointestinal malignancy and the microbiome. *Gastroenterology*, 146, 1534–1546.

Abt, M.C. ve Artis, D. (2009). The intestinal microbiota in health and disease: the influence of microbial products on immune cell homeostasis. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 25 (6), 496-502.

Abul, K. Abbas. (1991). Immunity to Microbes. In: Lichtman, A.H., Pober, J.S., Abul, K. Abbas (eds). *Cellular and Molecular İmmünology*. Philadelphia: WB Saunders, 301-17.

Adlercreutz, H. ve Mazur, W. (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann. Med.*, 29, 95–120.

Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N. and Ichikawa H. (2007). Curcumin: The Indian solid gold. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 595, 1-75.

Ammendolia, M.G., Iosi, F., De Berardis, B., Guccione, G., Superti, F., Conte, M.P., Longhi C. (2014). *Listeria monocytogenes* behaviour in presence of non-UV-irradiated titanium dioxide nanoparticles. *PLoS One*, 9, e84986.

Alagawany, M.M., Farag, M.R., Dhama, K., El-Hack A., M.E., Tiwari, R. ve Alam, G.M. (2015). Mechanisms and Beneficial Applications of Resveratrol as Feed Additive in Animal and Poultry Nutrition: A Review. *Int. J. Pharmacol.*, 11 (3), 213-221.

Alenazi, M.M. (2013). Neuroprotective effect of silymarin by modulation of endogenous biomarkers in streptozotocin induced painful diabetic neuropathy. *Br. J. Pharmacol. Toxicol.*, 4 (3), 110–120.

Allison, D.G. (2003). The biyofilm matrix. *Biofouling*, 19 (2), 139-150.

Anspach, F.B. (2001). Endotoxin removal by affinity sorbents. *J. Biochem. and Biophys.Met.*,49, 665-681. *Applications*, 4, 357–362.

Aponte, T.R. (2018). Green Tea Polyphenol EGCG-S as an Antimicrobial Agent. Yüksek Lisans Tezi, Montclair State University, College of Science and Mathematics, *Dissertations and Culminating Projects*. 118.

Ardizzone, S. ve Porro, G.B. (2005). Biologic therapy for inflammatory bowel disease. *Drugs*, 65, 2253–2286.

Ayaz, C. (2008). Kloramfenikol ve tiamfenikol. GüncelBilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: *Bilimsel Tıp Yayınevi*, p.479-87.

Bai, J.R., Wu, Y.P., Elena, G., Zhong, K. ve Gao, H. (2019). Insight into the effect of quinic acid on biofilm formed by *Staphylococcus aureus*. *RSC Adv.*, 9, 3938-3945.

Bauer, W.D. ve Robinson, J.B. (2002). Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *COBIOT*, 13, 234-237.

Baur, J.A. ve Sinclair, D.A. (2006). Therapeutic Potential of Resveratrol: The *in vivo* Evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5 (6), 493-506.

Bayhün, S. (2008). Klinik Ve Gıda Kaynaklı Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus*'un Antibiyotik Dirençliliklerinin Karşılaştırılması Ve Beta-Laktamaz Aktivitelerinin Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 5s.

Berridge, M.V., Tan, A.S. (1998). Trans-plasma membrane electron transport: a cellular assay for NADH and NADPH-oxidase based on extracellular, superoxide-mediated reduction of the sulfonated tetrazolium salt WST-1. *Protoplasma*, 205, 74–82.

Bilgehan, H. (2000). Fermentasyon yapmayan Gram (-) bakteriler H. Bilgehan (ed): Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları "kitabı, Fakülteler Kitapevi, İzmir, 422.

Bischoff, S.C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J.D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A., Wells, J.M. (2014). Intestinal permeability a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.*,14, 189.

B. Makhoul, L., Slimani, S., Madani, K. (2013). Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Ind. Crops. Prod.*, 41, 85–89.

Borges, A., Saavedra, M.J. ve Simoes, M. (2012). The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling*, 28, 7, 755-767.

Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M.J. ve Simoes, M. (2013). Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microb. Drug. Resist.*, 19, 4.

Borges, A., Saavedra, M.J. ve Simoes M. (2014). Antibiofilm activity of plant molecules against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Planta Med.*, 80, 120.

Camara, M. (2007). Quorum sensing: A cell-cell signalling mechanism used to coordinate behavioural changes in bacterial populations. <http://wmc7.liacs.nl/proceedings/WMC7Camara.pdf>. (Erişim tarihi: 12.02.2019)

Camarota, G., Branca, G., Ardito, F., Sanguinetti, M., Ianiro, G., Cianci, R., Torelli, R., Masala, G., Gasbarrini, A., Fadda, G., Landolfi, R., Gasbarrini, G. (2010). Biofilm demolition and antibiotic treatment to eradicate resistant *Helicobacter pylori*: a clinical trial. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.*, 8, 817-820.

Carron, M.A., Tran, V.R., Sugawa, C. ve Coticchia, J.M., (2006). Identification of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa. *J. Gastrointest. Surg. official J. Soc. Surg. Alimentary Tract*, 10, 712-717.

Castrejon, A.D.R., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L.W. ve Huyskens-Keil, S. (2008). Phenolic profile ve antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food. Chem.*, 109, 564–572.

Cellini, L., Grande, R., Di Campli E., Di Bartolomeo, S., Di Giulio, M., Traini, T., Trubiani, O. (2008). Characterization of an *Helicobacter pylori* environmental strain, *J. Appl. Microbiol.*, 105, 761-769.

Chandar, B., Poovitha, S., Ilango, K., Kumar R.M. ve Parani M. (2017). Inhibition of New Delhi Metallo- β -Lactamase 1 (NDM-1) Producing *Escherichia coli* IR-6 by Selected Plant Extracts and Their Synergistic Actions with Antibiotics. *Front. Microbiol.*, 8, 1580.

Chang, S.S. ve Kibel, A.S. (2008). The role of systemic cytotoxic therapy for prostate cancer. *BJU Int.*, 103, 8–17.

Chen, J.C., Ho, T.Y., Chang, Y.S., Wu, S.L. ve Hsiang, C.Y. (2006). Anti-diarrheal effect of *Galla chinensis* on the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and ganglioside interaction. *J. Ethnopharmacol.*, 103, 3, 385–391.

Cho, H.S., Lee, J.H., Cho, M.H. ve Lee, J. (2015) Red wines and flavonoids diminish *Staphylococcus aureus* virulence with anti-biofilm and anti-hemolytic activities. *Biofouling*, 31, 1, 1-11.

Choi, K.C., Lee, Y.H., Jung, M.G., Kwon, S.H., Kim, M.J., Jun, W.J., Lee, J., Lee J.M. ve Yoon H.G. (2009). Gallic acid suppresses lipopolysaccharide-induced nuclear factor-kappaB signaling by preventing RelA acetylation in A549 lung cancer cells. *Mol. Cancer Res.*, 7, 2011–2021.

CLSI. (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. CLSI document M7-A7, 7th ed., vol. 26, no. 2. CLSI, Wayne, PA.

CLSI. (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for Bacteria that grow aerobically, approved standard. 9th ed. CLSI document M07-A9. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Cominelli, F. (2004). Cytokine-based therapies for Crohn's disease new paradigms. *N. Engl. J. Med.*, 351, 2045–2048.

Coenye, T. ve Nelis, H.J. (2010). *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*, 83, 89–105.

Costerton, J.W., Geesey, G.G. ve Cheng G.K. (1978). How bacteria stick. *Sci. Am.*, 238, 86-95.

Costerton, J.W., Chen, K.J., Geesey, G.C., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M. ve Marrie, T.J. (1987). Bacteria biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.*, 41, 435– 464.

Costerton, J.M. (1999). Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 11, 217-221.

Costerton, J.W., Stewart, P.S. ve Greenberg, P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-1322.

Croft, K.D. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolics acids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 854, 435–42.

Cruz, C.D., Shah, S. ve Tammela, P. (2018). Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for Gram-positive clinical reference strains. *BMC. Microbiology*, 18, 173.

D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., ve Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 43, 348–361.

Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., Colombe, J.F. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 115, 1405-1413.

Das, B. ve Patra, S. (2017). Chapter 1-Antimicrobials: Meeting the Challenges of Antibiotic Resistance Through Nanotechnology. *MNT.*, 1-22.

Dautle, M.P., Wilkinson, T.R., Gauderer M.W. (2003). Isolation and identification of biofilm microorganisms from silicone gastrostomy devices, *J. Pediatr. Surg.*, 38, 216-220.

Davey, M.E. ve O'toole, G.A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, *Microbiol. Mol. Biol. R.*, 64 (4), 847-867.

De Maria, S., Scognamiglio, I., Lombardi, A., Amodio, N., Caraglia, M., Carten, M. , Ravagnan, G., ve Stiuso, P. (2013). Polydatin, a natural precursor of resveratrol, induces cell cycle arrest and differentiation of human colorectal Caco-2 cell. *J. Transl. Med.*, 11, 264.

Denkhaus, E., Meisen, S., Telgheder, U. ve Wingender, J. (2007). Chemical and physical methods for characterisation of biofilms, *Microchim. Acta.*, 158, 1-27.

Dietrich, H., Rechner, A., Patz, C.D. (2004) Bioactive compounds in fruit and juice. *Fruit Process*,1:50–55.

Djakpo, O. ve Yao, W. (2010). *Rhus chinensis* and *Galla Chinensis*-Folklore to modern evidence. *Phytother. Res.*, N24, 12, 1739–1747.

Donlan, R.M. (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.*, 7 (2), 277-81.

Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 881–890.

Donlan, R.M. ve Costerton, J.V. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15, 167–193.

Drenkard, E. (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.*, 5, 1213-1219.

Drummond, E.M., Harbourne, N., Marete, E., Martyn, D., Jacquier, J.C., O’Riordan, D. ve Gibney, E.R. (2013). Inhibition of Proinflammatory Biomarkers in THP1 Macrophages by Polyphenols Derived From Chamomile, Meadowsweet and Willow bark. *Phytother. Res.* 27, 588–594.

Dubos, R.J. (1966). The microbiota of the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 51, 868-74.

Dugo, L., Belluomo, M.G., Fanali, C., Russo, M., Cacciola, F., Mauro Maccarrone, M., ve Sardanelli, A.M. (2017). Effect of Cocoa Polyphenolic Extract on Macrophage Polarization from Proinflammatory M1 to Anti-Inflammatory M2 State. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 6293740, 11 pages.

E. Aksöz, B. ve Ertan, R. (2011). Chemical and Structural Properties of Chalcones. *I. Fabad. J. Pharm. Sci.*, 36, 223-242.

Ekbul, A. (2004). Diyetel Polifenoller ve Kardiyovasküler Sistem. *T. Klin. Kardiyoloji*, 48-54.

Erk, H., Doğanelli, M.Z., Akkajen, C. ve Öcal, H., (1994). Veteriner Doğum Bilgisi ve Jinekoloji, A.Ü. Vet. Fak. Yayın no: 275, A.Ü. Vet. Fak., Ankara, 35-46.

Erdem, B. (1999). Pseudomonaslar. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ustaçelebi ed. Güneş Kitabevi, Ankara, 551-558.

Erol, İ. (2007). Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. 1. Baskı. Ankara: Pozitif Matbaacılık Ltd şti.

Farzaei M.H., Bahramsoltani, R., Abdolghaffari, A.H., Sodagari, H.R., Esfahani, S.A. ve Rezaei, N. (2016). A mechanistic review on plant-derived natural compounds as dietary supplements for prevention of inflammatory bowel disease. *Expert Rev. Gastroent.*,10 (6),745-758.

Federle, M.J. ve Bassler, B. (2003). Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.*, 112 (9), 1291-1299.

Flemming, H.C. (2002). Biofouling in water systems cases, causes and countermeasures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 629–640.

Flemming, H.C. ve Wingender J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)–Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol.*, 43, 1–8.

Flemming, H.C. ve Wingender J. (2002). Extracellular polymeric substances: structure, ecological functions, technical relevance, p. 1223–1231. In G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*, vol. 3. Wiley, New York, NY.

Flemming, H.C., Wingender, J., Mayer, C., Korstgens, V. ve Borchard, W. (2000). Cohesiveness in biofilm matrix polymers. In: Allison D G, Gilbert P, Lappin-Scott H., Wilson M (eds) *Community Structure and Co-operation in Biofilms. SGM* Volume 59, Cambridge University Press, Cambridge, pp 87–105.

Foitzik, T., Kruschewski, M., Kroesen, A., Buhr, H.J. (1999). Does microcirculation play a role in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases?

Answers from intravital microscopic studies in animal models. *Int. J. Colorectal Dis.*, 14, 29-34.

Forester, S.C. ve Waterhouse, A.L. (2010). Gut Metabolites of Anthocyanins, Gallic Acid, 3-O-Methylgallic Acid, and 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde, Inhibit Cell Proliferation of Caco-2 Cell. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 5320–5327.

Forester, S.C., Choy, Y.Y., Waterhouse, A.L., ve Oteiza, P.I. (2014). The Anthocyanin Metabolites Gallic Acid, 3-O-Methylgallic Acid, and 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde Decrease Human Colon Cancer Cell Viability by Regulating Pro-Oncogenic Signals. *Mol. Carcinog.* 53, 432–439.

Forstner, G., Wesley, A., Forstner, J. (1982). Clinical aspects of gastrointestinal mucus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 144, 199-244.

Frolund, B., Palmgren, R., Keiding, K. ve Nielsen, P.H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.*, 30, 1749–1758.

Fukui, H. (2016). Increased Intestinal Permeability and Decreased Barrier Function: Does It Really Influence the Risk of Inflammation? *Inflamm. Intest. Dis.*, 1 (3), 135–145.

Fulghesu, L., Giallorenzo, C. ve Savoia, D. (2007). Evaluation of different compounds as quorum sensing inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 19, 388–390.

Galanos, C. ve Freudenberg, M.A. (1993). Mechanisms of endotoxin shock ve endotoxin hypersensitivity. *Rev. Immunobiol.*, 187 (3-5), 346-56.

Galluzzi, L., Aaronson, S.A., Abrams, J., Alnemri, E.S., Andrews, D.W. ve Baehrecke, E.H. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes, *Cell Death Differ.*, 16 (8), 1093-1107.

Gary, L.S. (1982). Intestinal Microflora. *Med. Clin. North Am.*, 66, 557.

Ghafoor, A., Hay, I.D. ve Rehm, B.H. (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 5238-5246.

Gilbert, P., Das, J. ve Foley, I. (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.*, 11 (1), 160–7.

Goodwin, J.A.S., Foster, C.F.A.N., (1989). Examination of the extracellular polymers produced by activated-sludge. *Microbios*, 57: 2179–2185.

Güneş, H., Gülen, D., Mutlu, R., Gümüş, A., Taş, T. ve Eren Topkaya, A., (2013). Antibacterial effects of curcumin: An in vitro minimum inhibitory concentration study. *Toxicol. Ind. Health*. 1-5.

Haas, C.N., Joffe, J., Heath, M. ve Jacangelo J., Anmangandla U. (1998). Predicting disinfection performance in continuous flow systems from batch disinfection kinetics. *Water Sci. Technol.*, 38 (6), 171–179.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. ve Stoodley P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2, 95-108.

Hartmann, G., Bidlingmaier, C., Siegmund, B., Albrich, S., Schulze, J., Tschoep, K., Eigler, A., Lehr, H.A., Endres, S. (2000). Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 292, 22-30.

Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., Iqbal, M., (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz. J. Infect. Dis.*, 15 (4), 305-311.

He, Z.Y., Shi, C.B., Wen, H., Li, F.L., Wang, B.L. ve Wang, J. (2011). Upregulation of p53 Expression in Patients with Colorectal Cancer by Administration of Curcumin. *Cancer Invest.*, 29, 3, 208-213.

Heggel, A.B., Andersen, T., Melvik, J.E., Bruzell, E., Kristensen, S. ve Tønnesen, H.H. (2010). Phototoxicity of curcumin loaded alginate foams to *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* in vitro. *J. Pharm. Pharmacol.* 62, 1458–1459.

Henke, J.M. ve Bassler, B. L. (2004). Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol.*, 650, 648-656.

Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., Parsek, M. R., Rice, S.A., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N., Kjelleberg, S. ve Givskov, M. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound, *Microbiology*, 148, 87-102.

Hoiby, N.A., (2014). Personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections, *Pathog. Dis.*, 70, 205-211.

Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. ve Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 35, 322–332.

Hoiby, N., Ciofu, O., Johansen, H.K., Song, Z.J., Moser, C., Jensen, P.O., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., Bjarnsholt T. (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. *Int. J. Oral. Sci.*, 3, 55-65.

Hood, S.K. ve Zottola, E.A., (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int. J. food Microbiol.*, 37, 145-153.

Hosny, I.M., El Kholy, W.I., Murad, H.A. ve El Dairouty, R.K. (2011) Antimicrobial activity of Curcumin upon pathogenic microorganisms during manufacture and storage of a novel style cheese ‘‘Karishcum’’. *Am. J. Sci.* 7, 611–618.

Huang, W.C., Hsu, B.H., Kao, P.M., Tao, C.W., Ho, Y.M.N, Kuo, C.W., Huang Y.L. (2016). Seasonal distribution and prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in different aquatic environments in Taiwan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 124, 37- 41.

Inoue, M., Sakaguchi, N., Isuzugawa, K., Tani, H. ve Ogihara, Y. (2000). Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis. *Biol. Pharm. Bul.*, 23, 1153–1157.

Isuzugawa, K., Inoue, M. ve Ogihara, Y. (2001). Catalase contents in cells determine sensitivity to the apoptosis inducer gallic acid. *Biol. Pharm. Bull.*, 24, 249–253.

Jadaun, V., Prateeksha, Singh, B.R., Paliya, B.S., Upreti, D.K., Rao, C.V., Rawat, A.K.S. ve Singh, B.N. (2015). Honey enhances the anti-quorum sensing activity and anti-biofilm potential of curcumin. *RSC. Adv.*, 5, 71060.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218–220.

Jansen, A., Mandic, A.D., Bennek, E., Frehn, L., Verdier, J., Tebrugge, I., Lutz, H., Streetz, K., Trautwein, C., Sellge, G. (2016). Antifood and anti-microbial IgG subclass antibodies in inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.*, 51, 1453-1461.

Jardak, M., Abdelli, F., Laadhar, R., Lami, R., Stien, D., Aifa, S., Mnif, S. (2017). Evaluation of biofilm-forming ability of bacterial strains isolated from the roof of an old house. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 63, 186–194.

Jayaraman, A. ve Wood, T.K. (2008). Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 10, 145- 146.

Jayaraman, P., Sakharkar, M.K., Lim, C.S., Tang, T.H., ve Sakharkar K.R. (2010). Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa in vitro*. *Int. J. Biol. Sci.*, 6, 556–568.

Jing, L., Zhenning, W., Mengrou, R., Guoren, H., Baochen, F., Xiujuan, B., Yanhui, L., ve Shuang, G.(2016). Antibacterial Effect of Gallic Acid against *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* Through Damaging Membrane Integrity. *Curr. Pharm. Biotechno.*, 17, 1153-1158.

Kampfer, A.A.M., Urban, P., Gioria, S., Kanase, N., Stone, V. ve Kinsner-Ovaskainen, A. (2017). Development of an *in vitro* co-culture model to mimic the human intestine in healthy and disease state. *Toxicol. In Vitro*, 45, 31-43.

Kandhare, A.D., Raygude, K.S., Ghosh, P. Ghule, A.E., Bodhankar, S.L. (2012). Neuroprotective effect of naringin by modulation of endogenous biomarkers in streptozotocin induced painful diabetic neuropathy. *Fitoterapia*, 83, (4), 650–659.

Kang, N., Shin, S., Lee, H., Lee, K. (2011). Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacol. Therapeut.*, 130 (3), 310–324.

Karaboz, İ. ve Sukatar, A. (2004). Bakterilerde sosyal davranışlar (bakterilerde iletişim 256 mekanizmaları), *Orlab Online Mikrobiyol. D*, 2 (5), 23-32.

Karaman, M., Fırıncı, F., Arıkan Ayyıldız, Z., Bahar, İ.H. (2013). Effects of Imipenem, Tobramycin and Curcumin on Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mikrobiyol. Bul.*, 47 (1), 192-194.

Karewicz, A., Bielska, D., Gzyl-Malcher, B., Kepczynski, M., Lach, R. ve Nowakowska M. (2011). Interaction of curcumin with lipid monolayers and liposomal bilayers. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 88, 231-9.

Kato, Y., Nagao, A., Terao, J. ve T. Osawa, T. (2003). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 1136-1139.

Khodayar, B., Farzaei, M.H., Abdolghaffari, A.H., Bahramsoltani, R., Baeri M., Ziarani, F.S., Mohammadi M., Rahimi, R. ve Abdollahi, M. (2018). The Protective Effect of the Gallic Acid Against TNBS-induced Ulcerative Colitis in Rats: Role of Inflammatory Parameters. *JIMC*, 1, 1, 34-42.

Kim, E.O., Lee, H., Cho, C.H., Kim, Y.J. ve Kim, D.O. (2011). Antioxidant Capacity and Anti-inflammatory Effect of the Ethyl Acetate Fraction of Dried Persimmon (*Diospyros kaki* Thumb.) on THP-1 Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 54(4), 606-611.

Kim, M.J., Seong, A.R., Yoo, J.Y., Jin, C.H., Lee, Y.H., Kim, Y.J., Lee, J., Jun, W.J., Yoon, H.G. (2011). Gallic acid, a histone acetyltransferase inhibitor, suppresses b-amyloid neurotoxicity by inhibiting microglial-mediated neuroinflammation. *Mol. Nutr. Food Res.*, 55, 1798–1808.

Kim, S.H., Jun, C.D., Suk, K., Choi, B.J., Lim, H., Park, S., Lee, S.H., Shin, H.Y., Kim, D.K., Shin, T.Y. (2006). Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol. Sci.*, 91, 123–131.

Kim, E.O., Lee, H., Cho, C.H., Kim, Y.J. ve Kim, D.O. (2011). Antioxidant Capacity and Anti-inflammatory Effect of the Ethyl Acetate Fraction of Dried Persimmon (*Diospyros kaki* Thumb.) on THP-1 Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 54 (4), 606-611.

Kim, J., Park, H.D. ve Chung, S. (2012). Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation. *Molecules*, 17, 9818-9834.

Klein, S.J., Stein, J., Dressman, J. (2005). Site-specific delivery of antiinflammatory drugs in the gastrointestinal tract: an in-vitro release model. *J. Pharm. Pharmacol.*, 57, 709-19.

Kokare, C.R., Chakraborty, S., Khopade, A.N. ve Mahadik, K.R. (2009). Biofilm: Importance and applications. *Indian. J. Biotechnol.*, 8, 159–168.

Kolouchova, I., Olga, Matatkova, O., Paldrychova, M., Kodes, Z., Kvasnickova, E., Sigler, K., Cejkova, A., Smidrkal, J., Demnerova, K., Masak, J. (2018). Resveratrol, pterostilbene, and baicalein: plant-derived anti-biofilm agents. *Folia Microbiol.*, 63, 261–272.

Koo, H., Duarte, S., Murata, R.M., Scott-Anne, K., Gregoire, S., Watson, G.E., Singh, A.P. ve Vorsa N. (2010). Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by *Streptococcus mutans* on saliva-coated apatitic surface and on dental caries development *in vivo*. *Caries Res.*, 44, 116–126.

Krawisz, J.E., Sharon, P. ve Stenson, W.F. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. *Gastroenterology*, 87, 1344–1350.

Kuppan, G., Balasubramanyam, J., Monickaraj, F., Srinivasan, G., Mohan, V. ve Balasubramanyam, M. (2010). Transcriptional regulation of cytokines and oxidative stress by gallic acid in human THP-1 monocytes. *Cytokine*, 49, 229–234.

Lebeaux, D., Ghigo, J.M. ve Beloin, C. (2014). Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 78 (3), 510–43.

Lee, J.H., Kim, Y.G., Ryu, S.Y., Cho, M.H. ve Lee, J. (2013). Resveratrol oligomers inhibit biofilm formation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa*.. *J. Nat. Prod.* 77, 168–172.

Lee, K.W.K., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S. ve Rice, S.A., (2013). Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *Microb. Ecol.*, 1-14.

Le Moal, V.L., Fayol-Messaoudi, D. ve Servin A.L. (2013). Compound(s) secreted by *Lactobacillus casei* strain Shirota YIT9029 irreversibly and reversibly impair the swimming motility of *Helicobacter pylori* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, respectively. *Microbiology*, 159, 1956-1971.

Leibovitz, A., Dan, M., Zinger, J., Carmeli, Y., Habot, B. ve Segal, R. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* and the oropharyngeal ecosystem of tube-fed patients. *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 956-959.

Lim, W.C., Wang, Y., MacDonald, J.K., Hanauer, S. (2016). Aminosalicylates for induction of remission or response in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 7, CD008870.

Liu, H., Ma, S., Hongrui, Xia, H., Lou, H., Zhub, F. ve Suna, L. (2018). Anti inflammatory activities and potential mechanisms of phenolic acids isolated from *Salvia miltiorrhiza* f. *alba* roots in THP-1 macrophages. *J. Ethnopharmacol.*, 222, 201–207.

Liu, M., Wu, X., Li, J., Liu, L., Zhang, R., Shao, D., Du, X. (2017). The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the *ica* operon. *Food Control*, 73, 613-618.

Loesche, W.J. (1969). Effect of bacterial contamination on cecal size and cecal contents of gnotobiotic rodents. *J. Bacteriol.*, 99 (2), 520-526.

Luis, A., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A. P. ve Domingues, F. (2014). Anti staphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids, *Biofouling*, 30, 1, 69-79.

Macheix, J.J., Fleurie,t A. ve Billot J. (1990). Fruit phenolics. Boca Raton, FL. *CRC Press*.

Madsen, J.S., Burmolle, M., Hansen, L.H. ve Sorensen, S.J. (2012). The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65, 183-195.

Mahbub, A.A., Maitre, C.L.L., Haywood-Small, S.L., McDougall, G.J., Cross, N.A. ve Nicola Jordan-Mahy, N. (2013). Differential Effects of Polyphenols on Proliferation and Apoptosis in Human Myeloid and Lymphoid Leukemia Cell Lines. *Anti-Cancer Agent. Me.*, 13, 1601-1613.

Maier, R.M., Pepper, I.L. ve Gerba, C.P. (2000). *Environ. Microbiol.: A Textbook*. Academic Press: San Diego.

Maisonneuv, E. ve Gerdes, K. (2014). Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell.*, 157, 539–548.

Maisuria, V.B., Hosseinidoust, Z. ve Tufenkji, N. (2015). Polyphenolic Extract from Maple Syrup Potentiates Antibiotic Susceptibility and Reduces Biofilm Formation of Pathogenic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81 (11), 3782–3792.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. ve Jime'nez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79 (5), 727–747.

Man, M. ve Chan, Y. (2002). Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem. Pharmacol.*, 63, 99-104.

Marcinkiewicz, J., Strus, M. ve Pasich, E. (2013). Antibiotic resistance: a “dark side” of biofilm-associated chronic infections. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 123 (6), 309-313.

Mateos, R., Pereira-Caro, G., Saha, S., Cert, R., Redondo-Horcajo, M., Bravo, L., Kroon, P.A. (2011). Acetylation of hydroxytyrosol enhances its transport across differentiated Caco-2 cell monolayers. *Food Chem.*, 125, 865-872.

McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S. (2011). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat. Rev. Microbiol.*, 10, 39-50.

Meyle, E., Stroh, P., Günther, F., Hoppy-Tichy, T., Wagner, C., Hansch, G.M. (2010). Destruction of bacterial biofilms by polymorphonuclear neutrophils: relative contribution of phagocytosis, DNA release, and degranulation. *Int. J. Artif. Organs.*, 33, 608-620.

Miura, M., Friedlander, R.M., Yuan, J. (1995). Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a Crm A-sensitive cell death pathway. *PNAS*, 92, 8318–8322.

Mossman, T. (1983). Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 65, 55-63.

Mukherjee, S., Moustafa, D., Smith, C.D., Goldberg, J.B. ve Bassler B.L. (2017). The RhlR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer, *PLoS Pathog.*, 13, e1006504.

Muller, S. ve Nebe-Von-Caron, G. (2010), Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. *FEMS Microbiol. Rev.*, 34, 554–587.

Nagy, M., Grancai, D. ve Mucaji, P. (2011). Farmakognozia Biogeneza Prirodných Latok; Osveta: Martin, TN, USA.

NIH HMP Working group, Peterson, J. Garges, S. Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J.A., Bonazzi, V., McEwen, J.E., Wetterstrand, K.A., Deal, C., Baker, C.C., Di Francesco, V., Howcroft, T.K., Karp, R.W., Lunsford, R.D., Wellington, C.R., Belachew, T., Wright, M., Giblin, C., David, H., Mills, M., Salomon, R., Mullins, C., Akolkar, B., Begg, L., Davis, C., Grandison, L., Humble, M., Khalsa, J., Little, A.R., Peavy, H., Pontzer, C., Portnoy, M., Sayre, M.H., Starke-Reed, P., Zakhari,

S., Read, J., Watson, B., Guyer, M. (2009). The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.*, 19, 2317–2323.

Nile, S.H., Ko' E.Y., Kim, D. H., Keum, Y.S. (2016). Screening of ferulic acid related compounds as inhibitors of xanthine oxidase and cyclooxygenase-2 with anti-inflammatory activity. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 26, 50–55.

Ogikubo, Y., Norimatsu, M., Noda, K., Takashi, J., Inotsume, M., Tsuchiya, M. ve Tamura, Y. (2004). Evaluation of the bacterial endotoxin test for quantification of endotoxin contamination of porcine vaccines. *Biologicals.*, 32, 88-93.

Onderdonk, A.B., Cisneros, R.L. ve Bronson, R.T. (1983). Enhancement of experimental ulcerative colitis by immunization with *Bacteroides vulgatus*. *Infect. Immun.*, 42, 783-788.

Oppenheim, J.J., Kovacs, E.J., Matsushima, K., Durum, S.K. (1986). There is more than one interleukin 1. *Immunol. Today*, 7, 2, 45.

Ormrod, D.J., Harrison, G.L. ve Miller, T.E. (1987). Inhibition of neutrophil myeloperoxidase activity by selected tissues. *J. Pharmacol. Methods*, 18, 137–142.

Özçelik, B., Kartal, M., ve Orhan, İ. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm. Biol.*, 49, 4, 396-402.

Pal, C., Bindu, S., Dey, S., Alam, A., Goyal, M., Iqbal, M.S., Maity, P., Adhikari, S.S. ve Bandyopadhyay U. (2010). Gallic acid prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in rat by blocking oxidative stress and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.*, 49, 258–267.

Palombo, E.A. (2011). Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 1–15.

Panaro, M.A., Carofiglio, V., Acquafredda, A., Cavallo, P. ve Cianciull, A. (2012). Anti-inflammatory effects of resveratrol occur via inhibition of lipopolysaccharide-induced NF-kB activation in Caco-2 and SW480 human colon cancer cells. *Br. J. Nutr.*, 108, 1623–1632.

Pandurangan, A.K., Mohebbali, N., Esa, N.M., Looi, C.Y., Ismail, S. ve Saadatdoust, Z. (2015). Gallic acid suppresses inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice: Possible mechanisms. *Int. Immunopharmacol.*, 28 (2), 1034–1043.

Paulo, L., Ferreira, S., Gallardo, E., Queiroz, J.A. ve Domingues, F. (2010). Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1533–1538.

Pepper, I.L., Rensing, C. ve Gerba, C.P. (2004). Environmental microbial properties and processes. *Environ. Monit. Assess.* 263-280.

Pereira, D.M., Valentao, P., Pereira, J.A. ve Andrade, P.B. (2009). Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 14, 2202–2211.

Polewski, K., Kniat, S. ve Slawinska, D. (2002). Gallic Acid a Natural Antioxidant in Aqueous and Micellar Environment: Spectroscopic Studies. *CTB*, 26 (2), 217-227.

Pravin Charles, M.V., Arunava, K., Bhuvaneshwar, O. ve Seetha, K.S. (2016). Inhibitory Effect of Curcumin on Biofilm Produced by Bacterial Pathogens. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 5 (12), 692-697.

Pryce R.J. (1972). Gallic acid as a natural inhibitor of flowering In *Kalanchoe blossfeldiana*. *Phytochemistry*, 11, 1911-1918.

Pulli, B., Ali, M., Forghani, R., Stefan, Schob, S., Hsieh, K.L.C., Wojtkiewicz, G., Jenny J., Linnoila, J.J. ve Chen, J.W. (2013). Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. *PLOS One*, 8, 7, e67976.

Rahimi, R., Nikfar, S. ve Abdollahi, M. (2007, a). Do anti-tumor necrosis factors induceresponse and remission in patients with acute refractory Crohn's disease? Asystematic meta-analysis of controlled clinical trials. *Biomed. Pharmacother.*, 61 (1), 75-80.

Rahimi, R., Nikfar, S. ve Abdollahi, M. (2007, b). Meta-analysis technique confirms the effectiveness of anti-TNF-alpha in the management of active ulcerative colitiswhen administered in combination with corticosteroids. *Med. Sci. Monit.*, 13 (7), 113-118.

Rashidi, L. ve Khosravi-Darani, K. (2011). The applications of nanotechnology in food industry. *Crit. Rev. Food Sci.*, 51, 723–730.

Rashidi, L., Vasheghani-Farahani, E., Soleimani, M., Atashi, A., Rostami, K., Gangi, F., Fallahpour, M. ve Tahouri, M.T. (2014). A cellular uptake and cytotoxicity properties study of gallic acid-loaded mesoporous silica nanoparticles on Caco-2 cells. *J. Nanopart. Res.*, 16, 2285.

Rasooli, I., Shayegh, S., Taghizadeh, M. ve Astaneh, S.D.A. (2008). Phytotherapeutic prevention of dental biofilm formation. *Phytother. Res.*, 22, 1162–1167.

Rathor R., Tulsawani R. ve Misra K. (2014). Hydro-ethanolic extract of *ganoderma lucidum* (hegl) shows anti-inflammatory activity on thp1 cytokines and nf-kb p65 response. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 5 (6), 2337-2348.

Raut, N., Pasini, P. ve Daunert, S. (2013). Deciphering bacterial universal language by detecting the quorum sensing signal, autoinducer-2, with a whole-cell sensing system. *Anal. Chem.*, 85, 9604-9609.

Redondo-Lopez, V., Cook, R.L. ve Sobel, J.D. (1990). Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis.*, 12, 856–872.

Remila, S., Atmani Kilani, D., Delemasur, S., Connat, J.L., Azib, L., Richard, T., Atmani, D. (2015). Antioxidant, cytoprotective, antiinflammatory and anti cancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *Eur. J. Integr. Med.*, 7, 274-286.

Rosso, R., Vieira, T.O., Leal, P.C., Nunes, R.J., Yunes, R.A. ve Creczynski-Pasa, T.B. (2006). Relationship between the lipophilicity of gallic acid n-alkyl esters' derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. *Bioorg. Med. Chem.*, 14 (18), 6409-6413.

Rubinstein, A. (1990). Microbially controlled drug delivery to the colon. *Biopharm. Drug Dispo.*, 11 (6), 465-475.

Rupasinghe, H.P.V., Boehm, M.M.A., Sekhon-Loodu, S., Parmar, I., Bors, B. ve Jamieson, A.R. (2015). Anti-Inflammatory Activity of Haskap Cultivars is Polyphenols-Dependent. *Biomolecules*, 5, 1079-1098.

Rutherford, S.T. ve Bassler, B.L. (2012). Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2, 124–127.

Sabina, F. (2014). Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 11 (5), 4745-4767.

Sadrudin, S. ve Arora, R. (2009). Resveratrol: biologic and therapeutic implications. *J. Cardiometab. Syndr. Spring*, 4 (2), 102-6.

Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stamatii, A., Zucco, F. (2005). The Caco2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and

culture-related factors on Caco2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* 21, 1–26.

Samuel B.S. ve Gordon, J.I. (2006). A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 10011–10016.

Sand, W. ve Gehrke, T. (1999). Analysis and function of the EPS from the strong acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. In: Wingender J., Neu T. R., Flemming H. C. (eds). *Bacterial Extracellular Polymeric Substances*. Springer, Berlin., pp 127–141.

Sarkar, R., Mondala, C., Berac R., Chakrabortya, S., Barikc, R., Roy, P., Kumara, A., Yadava, K.K., Choudhuryd, J., Chaudharyb, S.K., Samantae, S.K., Karmakara, S., Dasf, S., Mukherjeea, P.K., Mukherjeed, J. ve Sen, T. (2015). Antimicrobial properties of *Kalanchoe blossfeldiana*: a focus on drug resistance with particular reference to quorum sensing-mediated bacterial biofilm formation. *J. Pharm. Pharmacol.* 67, 951–962.

Savage, D.C. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.*, 31, 107–133.

Savage, D.C., Dubos, R. (1968). Alterations in the mouse cecum and its flora produced by antibacterial drugs. *J. Exp. Med.*, 128 (1), 97-110.

Segal, R., Pogoreliuk, I., Dan, M., Baumoehl, Y. ve Leibovitz, A. (2006). Gastric microbiota in elderly patients fed via nasogastric tubes for prolonged periods. *J. Hosp. Infect.*, 63, 79-83.

Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C., ve Finlay, B.B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.*, 90 (3), 859-904.

Setthacheewakul, S., Mahattanadul, S., Phadoongsombut, N., Pichayakorn, W. ve Wiwattanapatapee, R., (2010). Development and evaluation of selfmicroemulsifying

liquid and pellet formulations of curcumin, and absorption studies in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 76, 475-85.

Schneider, Y., Vincent, F., Duranton, B., Badolo, L., Gosse, F., Bergmann, C., Seiler, N. ve Raul, F. (2000). Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett.*, 158, 85-91.

Schultz, J. ve Kaminker, K. (1962). Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Arch. Biochem. Biophys.*, 96, 465–467.

Shao, D., Li, J., Tang, R., Liu, L., Shi, J., Huang, Q. ve Yang, H. (2015). Inhibition of Gallic Acid on the Growth and Biofilm Formation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. *J. Food Sci.*, 80, 6.

Shayegh, S., Rasooli, I. (2008). Phytotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque. *Nat. Prod.Res.*, 22, 428–439.

Shen, L., Ji, H.F. (2012). The pharmacology of curcumin: is it the degradation products. *Trends Mol. Med.*, 18 (3), 138- 144.

Sifri, C.D. (2008) . Healthcare epidemiology: quorum sensing: bacteria talk sense. *Clin. Infect. Dis.* 47, 1070-1076.

Silva, L.N., Zimmer, K.R., Macedo, A.J. ve Trentin,D.S. (2016). Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chem. Rev.*, 116, 9162–9236.

Simon, G.L. ve Gorbach, S. H. (1984). *Gastroenterology*, 86, 174.

Sivaprakasam, S., Bhutia, Y.D., Yang, S. ve Ganapathy, V. (2017). Short-Chain Fatty Acid Transporters: Role in Colonic Homeostasis. *Compr. Physiol.*, 8 (1), 299-314.

Sivasothy, Y., Sulaiman, S.F., Ooi, K.L., Ibrahim, H. ve Awang, K. (2013). Antioxidant and antibacterial activities of flavonoids and curcuminoids from Zingiber spectabile Griff. *Food Control* 30, 714–720.

Slebioda, T.J. ve Kmiec Z. (2014). Tumour necrosis factor superfamily members in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Mediat. Inflamm.*, ID 325129, 15 p.

Slobodnikovo, L., Fialova, S., Rendekova, K., Kovac, J., ve Mucaji, P. (2016). Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. *Molecules*, 21, 1717.

Smith, A.C. ve Podolsky, D.K. (1986). Colonic mucin glycoproteins in health and disease. Colonic mucin glycoproteins in health and disease. *Clin. Gastroenterol.*, 15 (4), 815-837.

Sodagari, H.R., Farzaei, M.H., Bahramsoltani, R., Abdolghaffari, A.H., Mahmoudi, M. ve Rezaei N. (2015). Dietary anthocyanins as a complementary medicinal approach for management of inflammatory bowel disease. *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 9 (6), 807-820.

Song, J.H., Yang, T.C., Chang, K.W., Han, S.K., Yi, H.K. ve Jeon, J.G. (2007). *In vitro* effects of a fraction separated from Polygonum cuspidatum root on the viability, in suspension and biofilms, and biofilm formation of mutans streptococci. *J. Ethnopharmacol.*, 112, 419–425.

Srivastava, A., Gupta, J., Kumar, S. ve Kumar A. (2017). Gut biofilm forming bacteria in inflammatory bowel disease. *Microb. Pathog.*, 112, 5-14.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I. ve Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115, 891–9.

Sumitkumar, J., Rahul, C. ve Dong-Shik, K. (2009). Effects of phenol and natural phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonasa aeruginosa*. *Biofouling*, 25, 4, 321-324.

Sun, Z., Wang, X., Andersson, R. (1998). Role of intestinal permeability in monitoring mucosal barrier function. History, methodology, and significance of pathophysiology. *Dig. Surg.*, 15, 386-397.

Sutherland, I.W. (2001). The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends microbiol.*, 9, 222-227.

Sutherland, L.R. ve MacDonald, J.K. (2003). Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 3, CD000543.

Szajdek, A. ve Borowska, E.J. (2008). Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 63, 147–156.

Tajbakhsh, S., Mohammadi, K., Deilami, I., Zandi, K., Fouladvand, M., Ramedani, E., Asayesh, G. (2008). Antibacterial activity of indium curcumin and indium diacetyl curcumin. *Afr. J. Biotechnol.*, 21, 3832–3835.

Tanrıverdi, E.Ç. ve Özkurt, Z., (2017). Kloramfenikol. *T. Klin. J Inf Dis-Special Topics*, 10, (1), 771-4.

Taylor, P.W., Hamilton-Miller, J.M.T. ve Stapleton, P.D. (2005). Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Sci. Technol. Bull.*, 2, 71–81.

Thomas, D. ve Day, F. (2007). Biofilm formation by plant associated bacteria. *Ann Rev Microbiol*, 61, 401-22.

Tolstanova, G., Deng, X., French, S.W., Lungu, W., Paunovic, B., Khomenko, T., Ahluwalia, A., Kaplan, T., Dacosta-Iyer, M., Tarnawski, A., Szabo, S. ve Sandor, Z.

(2012). Early endothelial damage and increased colonic vascular permeability in the development of experimental ulcerative colitis in rats and mice. *Lab. Invest.*, 92 (1), 9-21.

Tulstrup, M.V., Christensen, E.G., Carvalho, V., Linninge, C., Ahrné, S., Højberg, O., Licht, T.R. ve Bahl, M.I. (2015). Antibiotic treatment affects intestinal permeability and gut microbial composition in Wistar Rats Dependent on Antibiotic Class. *PLoS One*. 10 (12) e0144854.

Tunalı, Y. (2015). *İmmünoloji*, Bursa: Dora Basım-Yayın.

Ubeda, C. ve Pamer E.G. (2012). Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends Immunol.*, 33, 459–466.

Ustaçelebi, Ş. (1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Öncü Basımevi; Sayfa:470-485.

Vanderheijden, C.A., Janssen, P. ve Strik, J. (1986). Toxicology of gallates a review and evaluation. *Food Chem. Toxicol.*, 24, 1067-1070.

Van der Post, S., Jabbar, K.S., Birchenough, G., Arike, L., Akhtar, N., Sjøvall, H., Johansson, M.E.V. ve Hansson, G.C. (2019). Structural weakening of the colonic mucus barrier is an early event in ulcerative colitis pathogenesis. *Gut*, 1, 1–10.

Velayos, F.S., Terdiman, J.P. ve Walsh, J.M. (2005). Effect of 5-aminosalicylate use on colorectal cancer and dysplasia risk: a systematic review and metaanalysis of observational studies. *Am. J. Gastroenterol.*, 100, 1345-1353.

Vieira, A., Teixeira, M.M. ve Martins, F.S. (2012). The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Front. Immunol.*, 4, 445.

Wahlang, B., Pawar, Y.B., Bansal, A.K. (2011). Identification of permeability-related hurdles in oral delivery of curcumin using the Caco-2 cell model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 77, 275–282.

Wang, Y., Lu, Z., Wu, H. ve Lv, F. (2009). Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 71–74.

Wang, S., Mateos, R., Goya, L., Amigo-Benavent, M., Sarria, B., Bravo, L. (2016). A phenolic extract from grape by-products and its main hydroxybenzoic acids protect Caco-2 cells against pro-oxidant induced toxicity. *Food Chem. Toxicol.*, 88, 65–74.

Watnick, P. ve Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.*, 182, 2675–2679.

Wingender, J., Neu, R.T. ve Flemming, H.C. (1999). Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function, 1st ed.; Springer: Berlin.

Winzer, K., Hardie, K.R. ve Williams, P. (2002). Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now e gone to lunch! *Curr. Opin. Microbiol.*, 5, 216–222.

Wu, Y., Bai, J., Zhong, K., Huang, Y., Qi, H., Jiang, Y. ve Gao, H. (2016). Antibacterial Activity and Membrane-Disruptive Mechanism of 3-p-trans-Coumaroyl-2-hydroxyquinic Acid, a Novel Phenolic Compound from Pine Needles of *Cedrus deodara*, against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 21, 1084.

Wu, S., Yunjie, Liu, Y., Zhang, H. ve Lei, L. (2019). The Pathogenicity and Transcriptome Analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Response to Water Extract of *Galla chinensis*. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.*, ID 3276156.

Xiao, J., Metzler-Zebeli, B.U., Zebeli, Q. (2015). Gut Function-Enhancing Properties and Metabolic Effects of Dietary Indigestible Sugars in Rodents and Rabbits. *Nutrients*, 7 (10), 8348-8365.

Xu, F., Byun, T., Dussen, H.J. ve Duke, K.R. (2003). Degradation of N-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase. *J. Biotechnol.*, 101, 89-96.

Xue, Z., Sendamangalam, V.R., Gruden, C.L. ve Seo, Y., (2012). Multiple roles of extracellular polymeric substances on resistance of biofilm and detached clusters. *Environ. Sci. Technol.*, 46, 13212-13219.

Zhang, J., Li, L., Kim, S.H., Hagerman, A.E. ve Lu, J. (2009). Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. *Pharm. Res.*, 26, 2066-2080.

Zhang, L., Lee, H., Grimm, M.C., Riordan, S.M., Day, A.S. ve Lemberg, D.A. (2014). *Campylobacter concisus* and inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, 20, 1259-1267.

Zhao, D., Jiang, Y., Sun, J., Li, H. Huang, M., Sun, X. ve Zhao, M. (2019). Elucidation of The Anti-Inflammatory Effect of Vanillin In Lps-Activated THP-1 Cells. *J. Food Sci.*, 84, 7, 1920-1928.

Zhao, J., Khan, I.A. ve Fronczek, F.R. (2011). Gallic acid. *Acta Crystallogr. E.*, 67, 316–317.

Zhao, W., Haller, V. ve Ritsch A. (2015). The polyphenol PGG enhances expression of SR-BI and ABCA1 in J774 and THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*, 242, 2, 611-617.

Zhou, H., Beevers, C.S. ve Huanq S. (2011). The targets of curcumin. *Curr. Drug Targets*, 12 (3), 332-47.

Zhu, L., Gu, P. ve Shen, H. (2019). Gallic acid improved inflammation *via* NF- κ B pathway in TNBS-induced ulcerative colitis. *Int. Immunopharmacol.*, 67, 129–137.

Zou, M., Tao, W., Ye, X. ve Liu, D. (2019). Evaluation of antimicrobial and antibiofilm properties of proanthocyanidins from Chinese bayberry (*Myricarubra* Sieb. Et Zucc.) leaves against *Staphylococcus epidermidis*. *Food Sci. Nutr.*, 0, 1–11.

..... (1997). Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals. R. Fish, P.J. Danneman, M. Brown and A. Karas (editors), Pharmacologic effects, (p, 57). (2. edition), USA.

İnternet Kaynakları

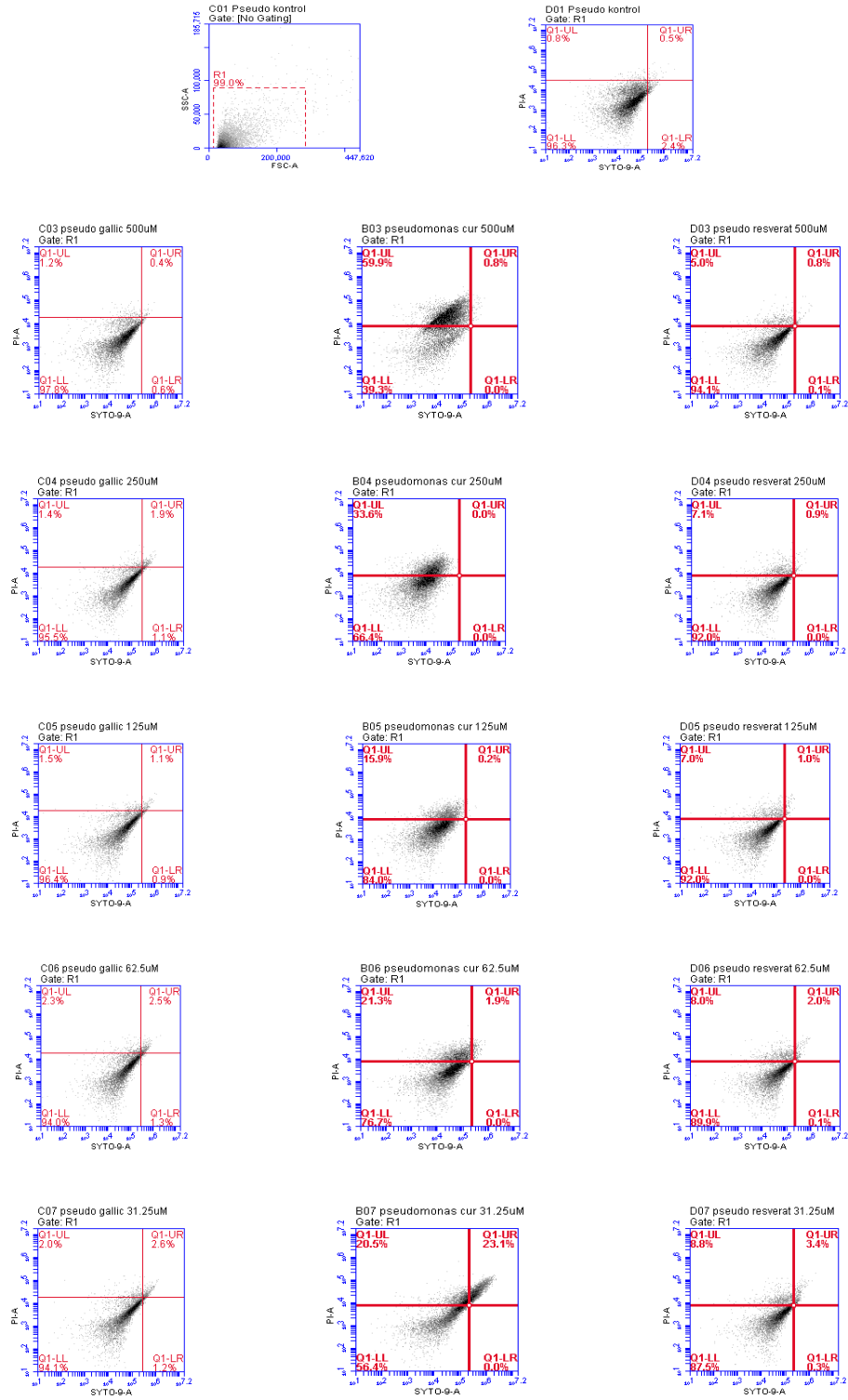
http-1:<https://www.infectioncontrolday.com/clabsi/biofilms-catheters-mechanisms-infection> (Erişim tarihi: 1.2.2016)

http-2:<http://www.diatek.com.tr/uploads/biofilm%20model.jpg> (Erişim tarihi: 8.9.2014)

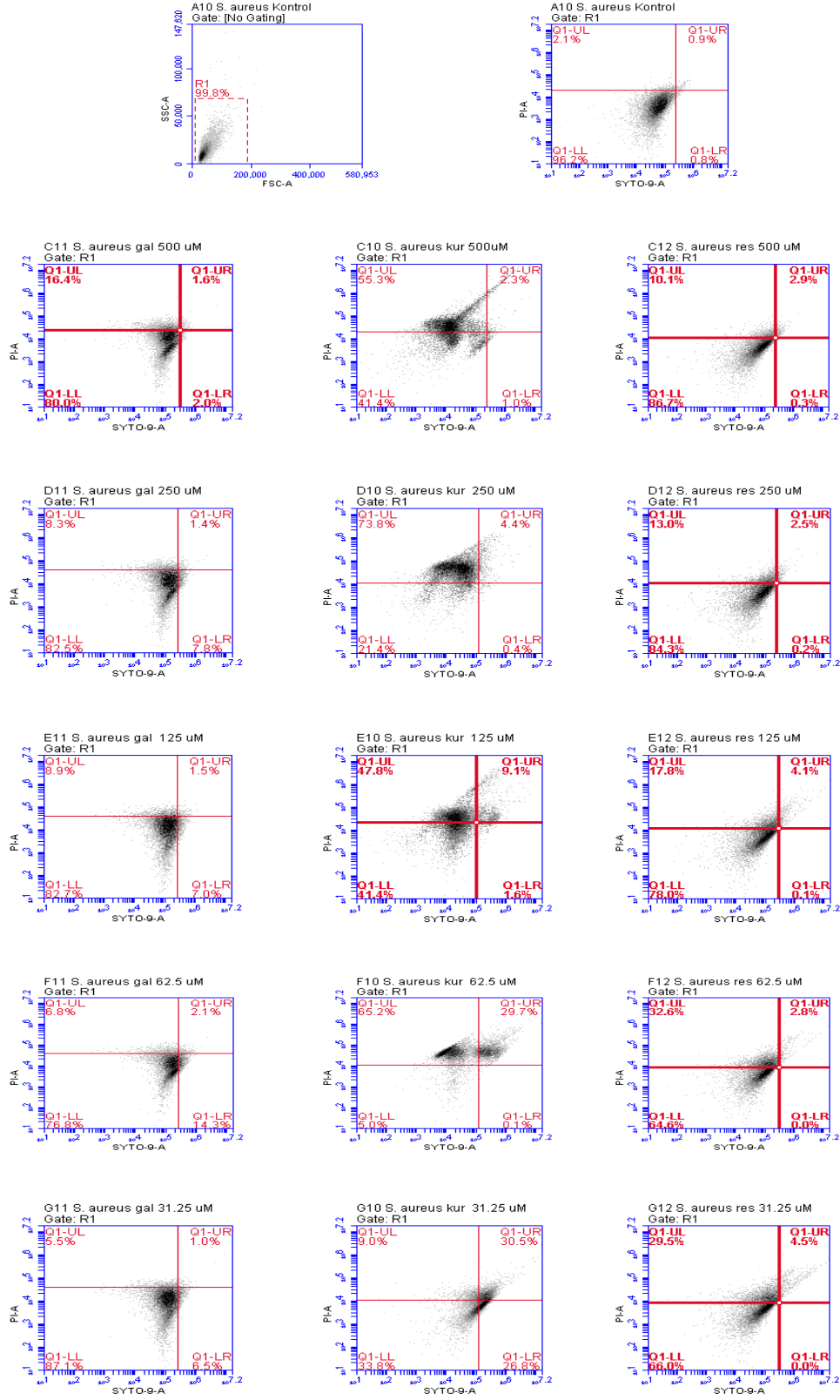
http-3:<https://www.elab.com.tr/bagirsaktaki-beyin-mikrobiyota/> (Erişim tarihi: 2.7.2018)

http-4:<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/evans-blue> (Erişim tarihi: 29.2.2012)

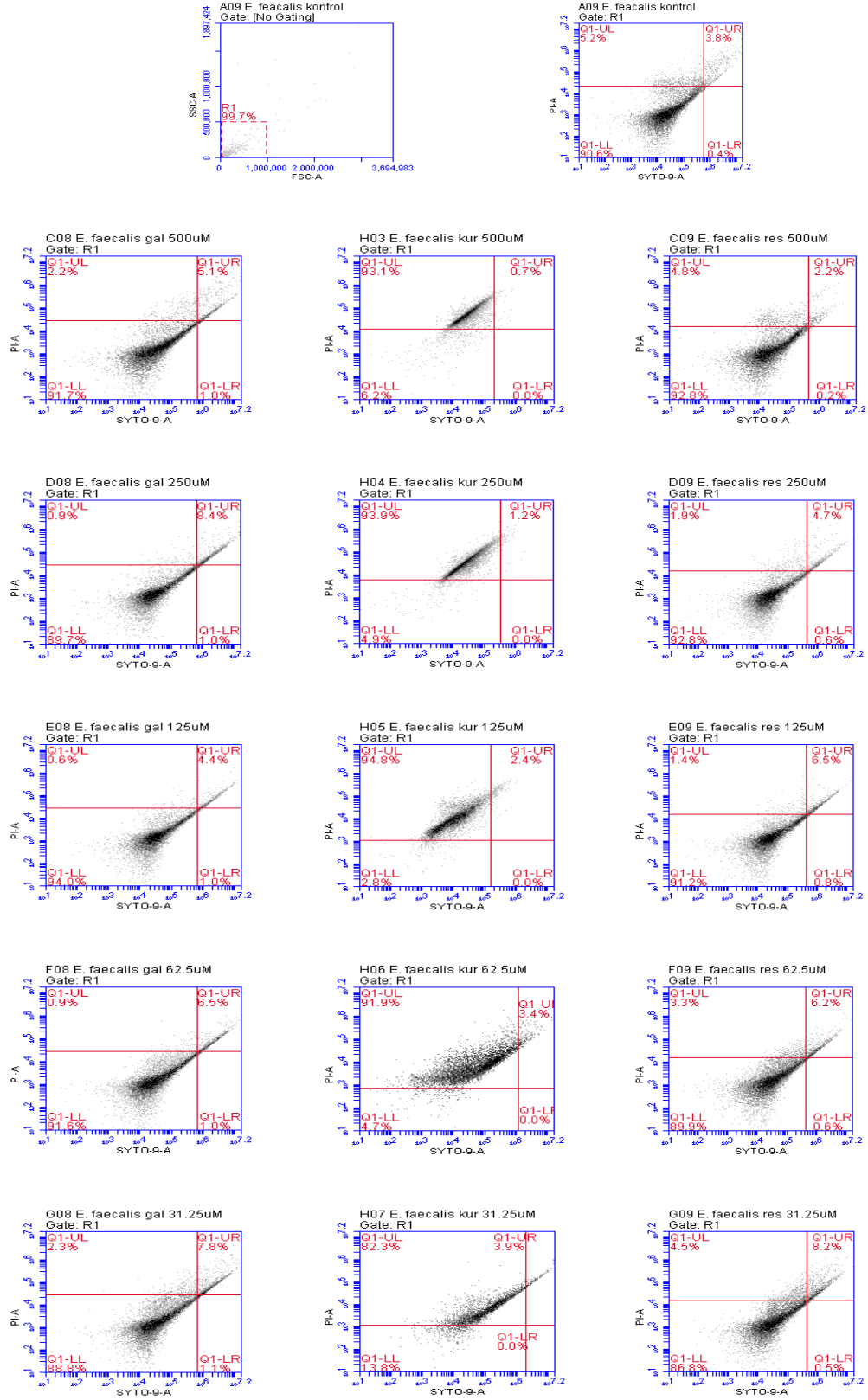
EK-1. SYTO-9/PI ile değerdendirilen polifenollerin *P. aeruginosa* üzerindeki etkisi



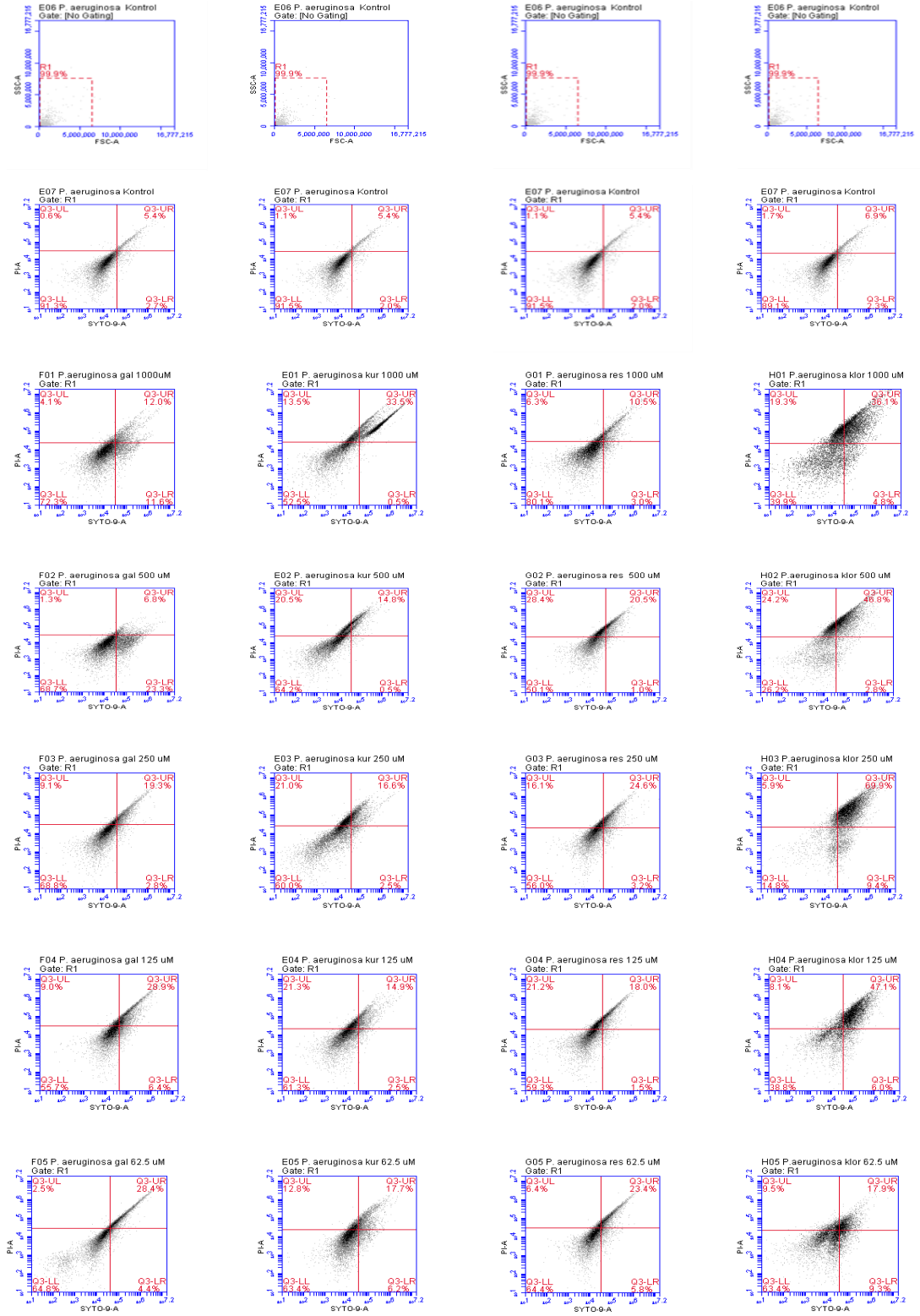
EK-2. SYTO-9/PI ile değeriendirilen polifenollerin *S. aureus* üzerindeki etkisi



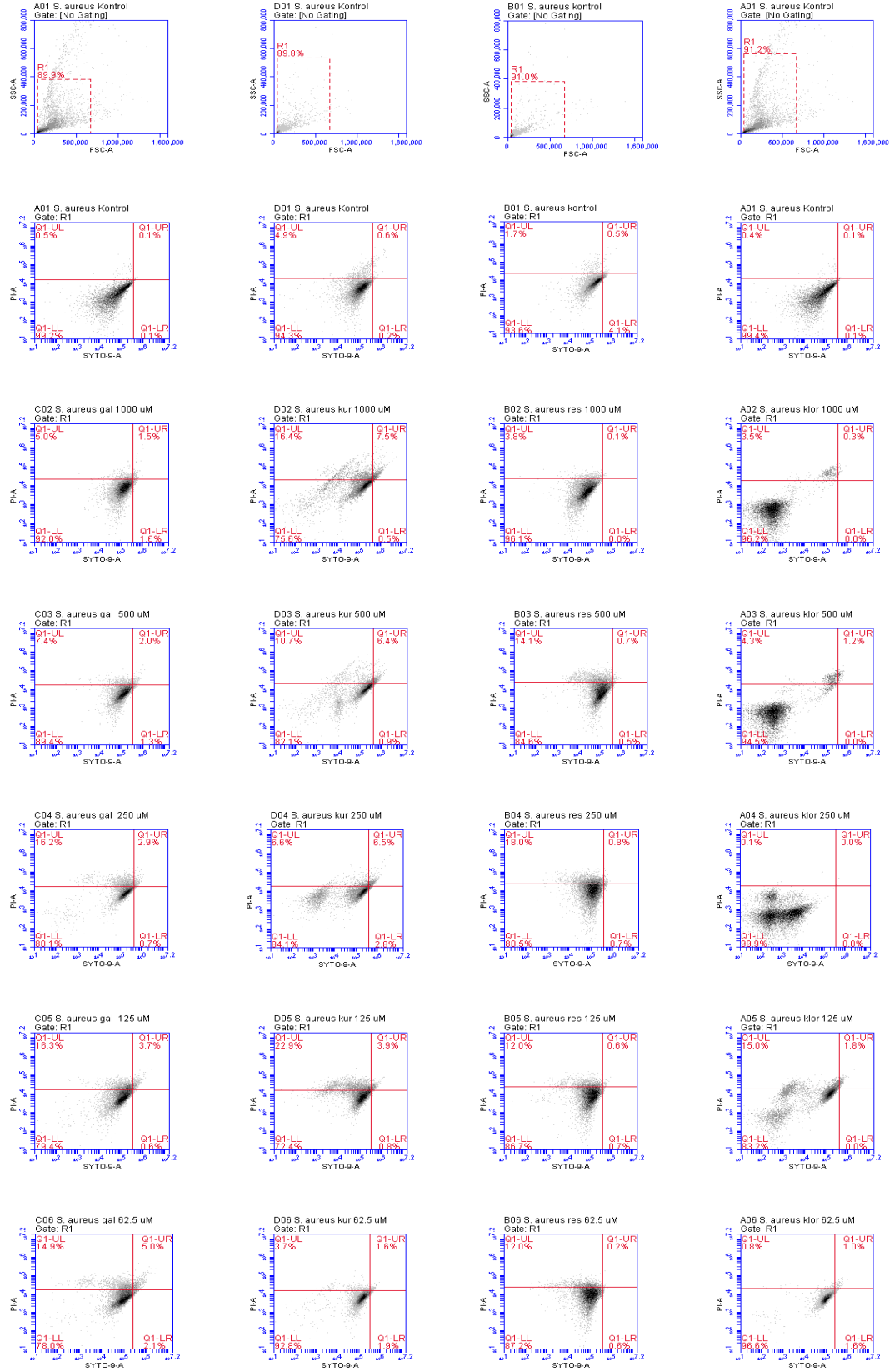
EK-3. SYTO-9/PI ile değ erlendirilen polifenollerin *E. faecalis*  zerindeki etkisi



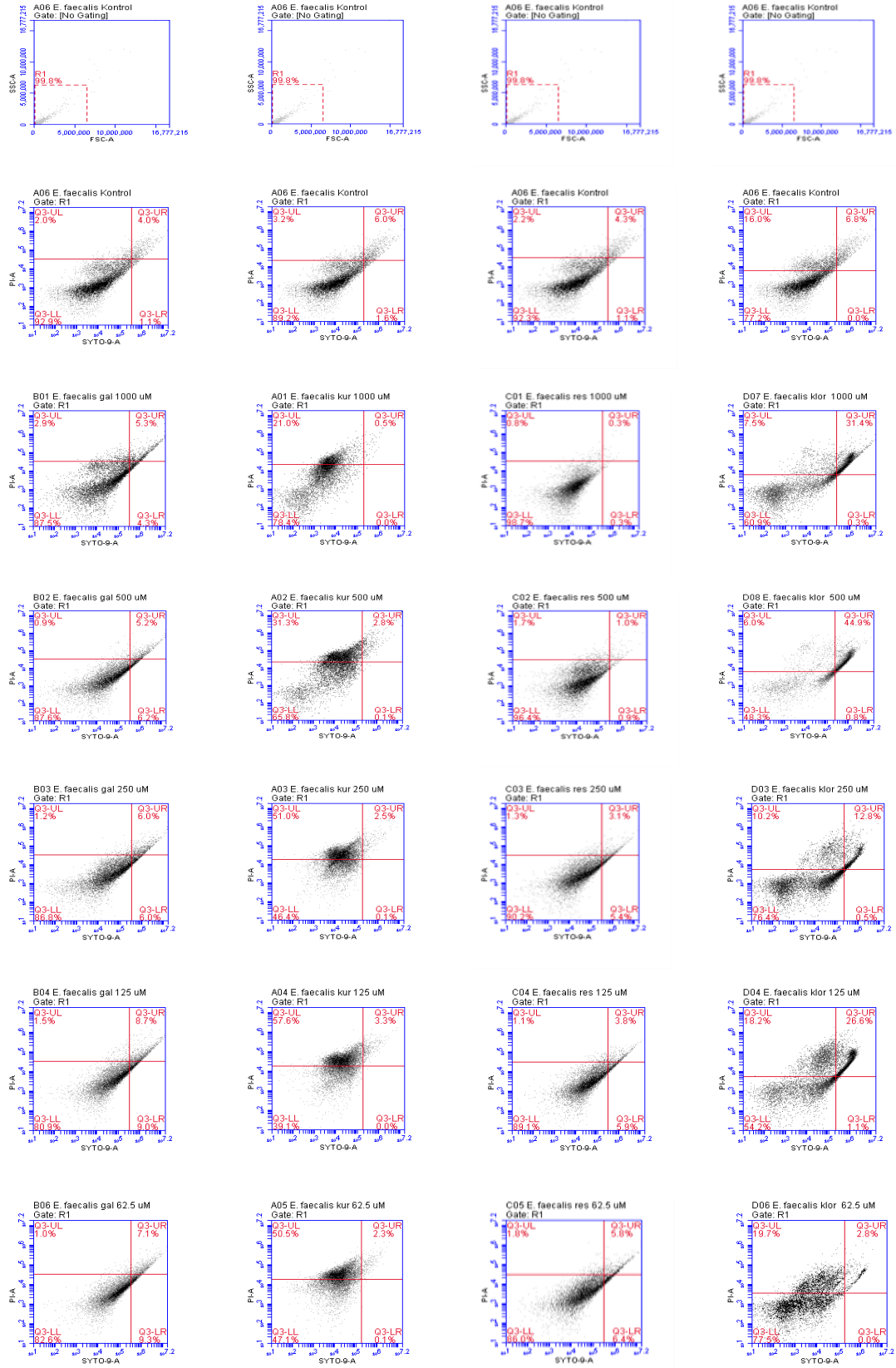
EK-4. SYTO-9/PI ile değeriendirilen polifenollerin *P. aeruginosa* üzerindeki antibiyofilm etkileri



EK-5. SYTO-9/PI ile değerdendirilen polifenollerin *E. faecalis* üzerindeki antibiyofilim etkileri



EK-6. SYTO-9/PI ile değeriendirilen polifenollerin *E. faecalis* üzerindeki antibiyofilim etkileri



CONCLUSION

Bioethics commission
Educational and scientific centre "Institute of biology and medicine"
of Taras Shevchenko National University of Kyiv

from 2.05.2019

Name of investigation: «Evaluation of immunological effects of sorbicillin-like compounds in *in vivo/in vitro* inflammatory bowel disease model» in cooperation Taras Shevchenko National University of Kyiv with Anadolu University within the program MEVLANA EXCHANGE PROGRAMME 2018-2019. **Authors:** G. Tolstanova, A. Zholos, L. Skivka, Z. Canturk, M. Dikmen, Yu. Oztük, L. Garmanchuk, T. Dovbynychuk, S. Gönel, O. Ivashchenko, V. Stetska, Y. Makedon.

Bioethics commission:

Order № 3 Educational and scientific centre "Institute of biology and medicine" from *head of the commission*, Sokur O.V., Doctor of Science; *vice head of the commission*, Makarchyk M.Ju., Professor, Doctor of Science; *members of the commission* - Beregova T.V., Professor, Doctor of Science, Zasekin D.A., Professor, Doctor of Veterinarian Science, Maljuk M.O., Professor, Doctor of Veterinarian Science, Levkiv M.Ju.; *secretary of the commission* - Dranitsina A., PhD.

Bioethics commission of Educational and scientific centre "Institute of biology and medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv examined scientific work «**Evaluation of immunological effects of sorbicillin-like compounds in *in vivo/in vitro* inflammatory bowel disease model**» by authors: G. Tolstanova, A. Zholos, L. Skivka, Z. Canturk, M. Dikmen, Yu. Oztük, L. Garmanchuk, T. Dovbynychuk, S. Gönel, O. Ivashchenko, V. Stetska, Y. Makedon.

Bioethics commission considered: all experiments were designed in accordance with Helsinki declaration (International medical assemble), international principles of the European Convention for the protect of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (European convention, Strasburg, 1986), Declaration of Principles on Tolerance (28 session of UNESCO, Paris, 1995), Universal Declaration on Bioethics and Human Rights (UN, 1997), norms of the Convention for the Protection of Human Rights in field of new biomedical technologies adopted in 1997 in the city and the article 26 of the Law of Ukraine "On protection of animals from cruelty" (№ 3447-IV, 21.02.2002).

All experiments are considered as accordant to norms of bioethics, following international regulations for the conduct of experimental work and clinical trials and may be used in publication.



Head of the commission

Dr.of Science Sokur O.V

Vice head of the commission

Prof., Dr.of Science Makarchyk M.Ju.

Members of the commission

Prof., Dr.of Science Beregova T.V.

Prof., Dr.of Science Zasekin D.A.

PhD Maljuk M.O

Levkiv M.Ju.

Secretary of the commission

PhD Dranitsina A.