

Gıda Fitokimyasallarının Periodontal Patojenlere Karşı İn Vitro Antimikrobiyal Potansiyellerinin Değerlendirilmesi[§]

Elif Burcu BALI*, Gülçin AKCA**, Demet ERDÖNMEZ***, Kübra ERKAN TÜRKMEN****, Necdet SAĞLAM*****

*Gazi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, Ankara

**Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

***Aksaray Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aksaray

****Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji/Biyoteknoloji Bölümü, Ankara

*****Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611 ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718 periodontal patojenlerine karşı gıdalarda bulunan fitokimyasallardan kuersetin, kurkumin, apigenin, pirogallol, gallik asit, luteolin ve hidroksitirozolün in vitro antimikrobiyal potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada agar kuyucuk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak fitokimyasalların antimikrobiyal potansiyelleri araştırılmıştır. Agar kuyucuk yönteminde fitokimyasalların antimikrobiyal aktiviteleri 3 mg/ml, mikrodilüsyon yönteminde ise 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.187, 0.093, 0.046, 0.023 ve 0.011 mg/ml konsantrasyonlarda incelenmiştir. Pozitif ve negatif kontrol olarak amoksisilin (20 µg/disk ve 0.04-0.0015 mg/ml) ve DMSO (≤%10) test edilmiştir.

Bulgular: Çalışma sonuçlarına göre, fitokimyasalların çoğunun patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve patojenler üzerinde en etkili fitokimyasalın kuersetin olduğu belirlenmiştir. Kuersetin, kurkumin, luteolin, apigenin ve gallik asit tüm patojenlere karşı en iyi antimikrobiyal potansiyeli olan fitokimyasallar olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda, %4 (v/v) ve daha az orandaki DMSO'nun patojenler üzerinde etkisiz olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Periodontal hastalıkların tedavisinde antibiyotik kullanımına ilave olarak, özellikle kurkumin, kuersetin, luteolin, gallik asit ve apigenin içeren gıdaların tüketimi uygun ve yararlı olabilir. Bu yüzden, ileride, güçlü antimikrobiyal ve antioksidan potansiyeli olan fitokimyasalların periodontal patojenlerin inhibisyon mekanizmalarına yönelik etkilerinin daha detaylı araştırılması ve bu fitokimyasalların etkin kullanımlarını belirlemek için ileri boyutta in vivo çalışmalar yapılması önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: Gıda fitokimyasalları, kuersetin, periodontal patojenler, antimikrobiyal potansiyel

ABSTRACT

Evaluation of In Vitro Antimicrobial Potentials of Dietary Phytochemicals Against Periodontal Pathogens

Objective: In this study, it is aimed to investigate the antimicrobial potential of the dietary phytochemicals including quercetin, curcumin, apigenin, pyrogallol, gallic acid, luteolin and hydroxytyrosol against the periodontal pathogenic bacteria including *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611 and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718.

Material and Methods: The antimicrobial potential of the dietary phytochemicals was investigated by using agar well diffusion and microdilution methods. The antimicrobial activities of the phytochemicals were both studied at a concentration of 3 mg/ml and also in concentrations of 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.187, 0.093, 0.046, 0.023 and 0.011 mg/ml using microdilution methods, respectively. Amoxicillin (20 µg/disc, 0.04-0.0015 mg/ml) and DMSO (≤10%) were tested as positive and negative controls, respectively.

Results: According to the results of this study, most of the phytochemicals had antimicrobial activity against all of the bacteria. The most effective phytochemical against pathogens was quercetin. The phytochemicals with the strongest antimicrobial potential were determined as quercetin, curcumin, luteolin, apigenin and gallic acid. In our study DMSO (≤4%, v/v) showed no antimicrobial effect on the pathogens.

Conclusion: In addition to the usage of antibiotics in the treatment of periodontal diseases, the consumption of the phytochemicals including especially curcumin, quercetin, luteolin, gallic acid and apigenin may be appropriate and helpful. Therefore, it is suggested that more detailed in vivo research about the inhibition mechanisms of the periodontal pathogens by potent phytochemicals should be performed and, further in vivo studies should be carried out to detect effective usage of these phytochemicals.

Keywords: Dietary phytochemicals, quercetin, periodontal pathogens, antimicrobial potential

Alındığı tarih: 12.06.2017

Kabul tarihi: 22.08.2017

Yazışma adresi: Elif Burcu Bali, Gazi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, Gölbaşı, Ankara

e-posta: e.burcubali@gmail.com

[§]Bu çalışma Gazi Üniversitesi BAP birimi (Proje No: 21/2015-01) tarafından desteklenmiştir. Bu çalışmanın bir bölümü TBD Biyokimya Günleri - Sivas 2016'da (2-5 Kasım 2016, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas) poster bildirisi olarak diğer bir bölümü Gıda, Metabolizma ve Sağlık: Biyoaktif Bileşenler ve Doğal Katkılar Kongresi'nde (28 Kasım 2016, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Periodontal hastalıklar, dişetinde inflamasyona, periodontal doku yıkımına ve alveolar kemik kaybına neden olan mikrobiyal, kronik, inflamatuar hastalıklardır⁽¹⁾. Dünyada yaygın ve yüksek oranda görülen hastalıklar olup, bu hastalıkların metabolik, aterosklerotik kardiyovasküler, romatizmal hastalıklar, aspirasyon pnömonisi gibi hastalıklara sahip duyarlı bireylerin sistemik sağlığına zarar verdiği bilinmektedir⁽²⁾. Bu hastalıklar *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella* sp. *Fusobacterium* sp. ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gibi polimikrobiyal enfeksiyon karakteri gösterebilen Gram negatif anaerop ve fakültatif bakteriler ile ilişkilidir⁽³⁻⁵⁾. Bu bakteriler, oksijen radikallerinin aşırı üretimini hızlandırarak kollajen ve periodontal doku yıkımına neden olabilmektedir. Antioksidanlar oksijen radikallerini ortamdan uzaklaştırılmakta ve kollajen yıkımını engelleyebilmektedir. Yetersiz beslenme doğrudan periodontal hastalıklara neden olmasa da, yetersiz beslenen insanlarda bu hastalıkların daha ciddi görüldüğü düşünülmektedir⁽⁶⁾. Özellikle antioksidanca zengin meyve sebze gibi bitkisel kaynaklı besinlerde bulunan fitokimyasallar bu tür hastalık risklerini azaltmakla ilişkilendirilmektedir⁽⁷⁾.

Türkiye’de toplam ilaç tüketimi içerisinde antibiyotikler %22’lik payla birinci sırada yer almaktadır⁽⁸⁾. Oral enfeksiyonların tedavisinde de yaygın olarak kullanılan çoğu antibiyotiğe karşı bakteriyel direnç oluşmaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde bu dirençten kaynaklanan oral hastalık sıklığındaki artış mevcut tedaviye ilaveten, güvenli, etkili ve ekonomik ürünlerin kullanım gereksinimini doğurmaktadır. Bu hastalıklara karşı ticari olarak kullanılan kimyasal ajanlar olmasına rağmen, bunlar oral mikrobiyotayı değiştirebilmekte ve istenmeyen yan etkiler oluşturabilmektedir. Bu yüzden bitkilerden izole edilen doğal fitokimyasallar sentetik kimyasallara iyi birer alternatif olarak

düşünülmektedir⁽⁴⁾.

Bu çalışmada soğan, brokoli, elma, avakado, mango, muz, siyah çay maydanoz, zeytin yağı, lahana, havuç, hardal, biber ve turp gibi gıdalarda etken fitokimyasal olarak tüketilen, yüksek antioksidan etkili kuersetin, kurkumin, pirogallol, gallik asit, luteolin, hidroksitirozol ve apigeninin *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611 ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718 patojenlerine karşı in vitro olarak antimikrobiyal potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Luteolin ve hidroksitirozolün mevcut patojenler üzerine antimikrobiyal potansiyelleri mikrodilüsyon yöntemiyle, ilk kez diğer fitokimyasalların aktiviteleri ile kıyaslanarak araştırılmıştır^(9,10). Buna ilaveten, çalışmamızda mevcut fitokimyasalların antimikrobiyal potansiyelleri agar kuyucuk yöntemiyle de ilk kez ortaya çıkarılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteriler: Çalışmada kullanılan *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611 periodontal patojenleri Gazi Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’ndan sağlanmıştır. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718 ise ticari olarak satın alınmıştır.

Bakterilerin üretimi: Çalışmada kullanılan periodontal patojenlerden *P. gingivalis* ve *P. intermedia*, Fastidious Anaerob Agar (FAA Lab M, İngiltere) besiyerine %10 koyun kanı, %10 vitamin K ve hemin (BioMérieux, Fransa) solüsyonu ilave edilerek tam otomatik anaerob kabinde (Electrotek, İngiltere) %80 N₂, %10 H₂O, %10 CO₂ atmosfer ortamında 37°C’de 5-7 gün boyunca inkübe edilerek üretilmiştir. *A. actinomycetemcomitans* ise %10 at serumu, %10 vitamin K ve hemin solüsyonu ilave edilerek hazırlanmış Tryptic Soy Serum Basitrasin

Vankomisin agarda (TSBV, Merck, Almanya), %10 CO₂'li etüvde 4-5 gün süre ile üretilmiştir.

Fitokimyasalların hazırlanması: Çalışmada kullanılan kuersetin (Sigma, ABD), kurkumin (Sigma, ABD), apigenin (Sigma, ABD), pirogallol (Sigma, ABD), luteolin (Sigma, ABD), hidrokstitirozol (Sigma, ABD) ve gallik asit (Merck, Almanya) ticari olarak satın alınmıştır. Pirogallol, hidrokstitirozol ve gallik asit distile suda, diğer fitokimyasallar ise %10 dimetilsülfoksit (DMSO)'te çözülerek stok olarak hazırlanmıştır. Stoklar uzun vadede -20°C'de saklanmıştır.

Fitokimyasalların Antimikrobiyal Potansiyellerinin Değerlendirilmesi

Agar difüzyon yöntemi: Fitokimyasalların patojenler üzerine antimikrobiyal aktivitesi anaerobik bakteriler üzerinde Koo ve ark.⁽¹¹⁾'nin yaptığı agar difüzyon yöntemi modifiye edilerek belirlenmiştir. Bu yöntemde göre, %10 koyun kanı, %10 vitamin K ve hemin solüsyonu içeren "Fastidious Anaerob Broth" (FAB, Merck, Almanya) veya %10 at serumu, %10 vitamin K ve hemin solüsyonu içeren "Triptik Soy Broth" (TSB, Merck, Almanya) besiyeri içerisinde 1.5x10⁸ CFU/ml (0.5 Mc Farland) bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonları eküvyon yardımıyla besiyerine ekilmiştir. Katı besiyerlerinde açılan kuyucuklara 100 µl, final konsantrasyonlardaki (3 mg/ml) fitokimyasallardan konulmuştur. *P. gingivalis* ve *P. intermedia* patojenleri anaerobik kabinde 37°C'de 5-7 gün, *A. actinomycetemcomitans* ise %10 CO₂'li etüvde 24-48 saat inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak çözücü %10 DMSO, pozitif kontrol olarak amoksisilin (20 µg/disk) kullanılmıştır. Patojenlere karşı oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek bakteri üremeleri değerlendirilmiştir. Deney üç kez yinelenerek, ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

Mikrodilüsyon yöntemi: Fitokimyasalların patojen bakterilere karşı minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri Zgoda ve ark.⁽¹²⁾'nin yöntemi modifiye edilerek belirlenmiştir. Bu yöntemde göre, 96 kuyucuklu mikropaklara 100 µl besiyeri konulduktan sonra ilk kuyucuğa test edilecek fitokimyasalın başlangıç konsantrasyonu aynı hacimde eklenip ½ oranında seri dilüsyonlar (3-0.01 mg/ml) yapılmıştır. Sonrasında her bir kuyucuğa 100 µl bakteri süspansiyonları (1.5x10⁸ CFU/ml) ilave edilmiş ve toplam hacim 200 µl'ye tamamlanmıştır. Kontrol grupları olarak ise kuyucuklara bakteri süspansiyonu, DMSO ve amoksisilin eklenmiştir. Bakteriler agar kuyucuk difüzyon yöntemindeki gibi inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda fitokimyasalların MİK ve MBK değerleri belirlenmiştir. MİK değeri büyümenin inhibe olduğu en düşük konsantrasyon, MBK ise hiçbir mikrobiyal üremenin görülmediği konsantrasyon olarak değerlendirilmiştir. Mikrodilüsyon yöntemi en az iki tekrar çalışılmıştır.

İstatiksel analiz: İstatiksel analizler SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY, ABD) istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Ortalama sonuçlar arasındaki farklılıklar varyans analizi (ANOVA) ile belirlenerek ortalama değerler Tukey testi ile karşılaştırılmıştır. İstatiksel anlamlılık değeri p<0.05 olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmada, agar kuyucuk difüzyon yönteminde, 3 mg/ml konsantrasyonda tüm fitokimyasalların *P. gingivalis*, *P. intermedia* ve/veya *A. actinomycetemcomitans* periodontal patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 1). Kuersetin *P. gingivalis*, *P. intermedia* ve *A. actinomycetemcomitans* patojenlerine karşı sırasıyla 20.50±0.20, 21.00±0.20 ve 19.00±0.10 mm zon çapıyla en iyi aktivite gösteren fitokimyasal olarak belir-

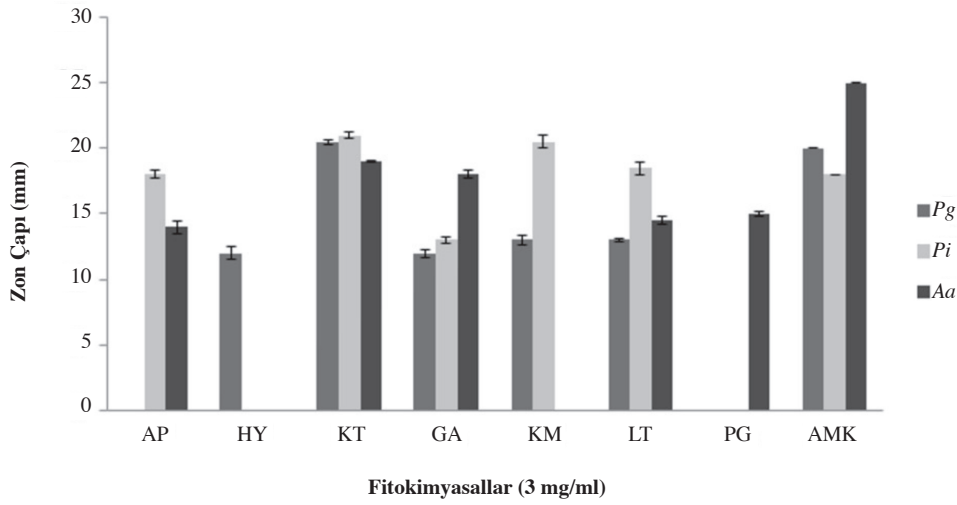
Tablo 1. Fitokimyasalların periodontal patojen bakterilere karşı oluşturduğu inhibisyon zonları (mm). Tablodaki sayılar üç tekrarlı deneyler sonucu elde edilen ortalama \pm standart sapma (SD) değerleridir.

Fitokimyasal (3 mg/ml)	Kuyucuk Difüzyon Yöntemi Zon Çapları Ortalama \pm SD (mm)		
	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718
Apigenin	-	18.00 \pm 0.30	14.00 \pm 0.50
Hidroksitirozol	12.00 \pm 0.50	-	-
Kuersetin	20.50 \pm 0.20	21.00 \pm 0.20	19.00 \pm 0.10
Gallik asit	12.00 \pm 0.30	13.00 \pm 0.20	18.00 \pm 0.30
Kurkumin	13.00 \pm 0.40	20.50 \pm 0.50	-
Luteolin	13.00 \pm 0.10	18.50 \pm 0.50	14.50 \pm 0.30
Pirogallol	-	-	15.00 \pm 0.20
%10 DMSO (Çözücü)	-	-	-
Amoksisilin (20 μ g/disk)	20.00 \pm 0.10	18.00 \pm 0.20	25.00 \pm 0.10

lenmiştir. Sonrasında *P. gingivalis* patojenine karşı diğer fitokimyasalların antimikrobiyal etkileri sırasıyla luteolin, hidroksitirozol, kurkumin ve gallik asit olarak belirlenmiş, pirogallol ve apigeninin ise bu bakteriye karşı antimikrobiyal aktivitesi görülmemiştir. *P. gingivalis* patojeni için hidroksitirozol ve gallik asit zon çaplarında anlamlı bir farklılık bulunmazken, kuersetin, kurkumin ve luteolin zon çaplarında anlamlı bir fark belirlenmiştir ($p<0.05$). *P. intermedia* patojenine karşı kuersetinden sonra diğer fitokimyasalların antimikrobiyal etkileri ise sırasıyla kurkumin, luteolin, apigenin ve gallik asit olarak belirlenmiştir. Hidroksitirozol ve pirogallol için antimikrobiyal aktivite saptanmamıştır. *A. actinomycetemcomitans* patojeninde ise diğer fitokimyasalların antimikrobiyal etkileri sırasıyla gallik asit, pirogallol, luteolin, apigenin, kurkumin ve hidroksitirozol olarak belirlenmiştir. *P. intermedia* ve *A. actinomycetemcomitans* patojenleri için her bir fitokimyasalın oluşturduğu zon çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Çalışmada, amoksisilin (20 μ g/disk) antibiyotiği patojenler üzerinde farklı antimikrobiyal aktivite gösterirken, %10 DMSO'nun bakteriler üzerinde antimikrobiyal bir etkinliği belirlenmemiştir. Kuersetin, kurkumin, luteolin, apigenin ve gallik asit patojenler üzerinde antimikrobiyal potansiyeli en iyi olan fitokimyasallar olarak saptanmıştır. En zayıf antimikrobiyal potansiyeli olan fitokimyasallar ise

hidroksitirozol ve pirogallol olarak belirlenmiştir (Şekil 1).

Çalışmada tüm fitokimyasalların *P. gingivalis*, *P. intermedia* ve *A. actinomycetemcomitans* patojenlerine karşı minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri belirlenmiştir. Kuersetinin mikrodilüsyon testinde de patojenlere karşı en etkili fitokimyasal olduğu belirlenmiştir. *P. intermedia* için kurkumin ve kuersetinin antimikrobiyal potansiyelleri (MİK ve MBK) eş değer bulunmuştur (Tablo 2). *P. gingivalis* için ise kuersetinden sonra en yüksek antimikrobiyal aktivite luteolin olarak belirlenmiştir. Hidroksitirozol, gallik asit ve kurkuminin MİK (0.75 mg/ml) ve MBK (1.5 mg/ml) değerleri aynı bulunmuştur. Pirogallol ve apigenin ise en düşük antimikrobiyal aktiviteli fitokimyasallar olarak belirlenmiştir. *P. gingivalis* için apigenin, kuersetin, luteolin ve pirogallolün mikrodilüsyon sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmiştir ($p<0.05$). Çalışmada *P. intermedia* patojenine karşı ise kuersetin ve kurkuminden sonra antimikrobiyal etkinlik sırasıyla luteolin>apigenin>gallik asit>pirogallol olarak belirlenmiştir. Hidroksitirozolon 3-0.01 mg/ml doz aralığında *P. intermedia* patojenine karşı antimikrobiyal etkinliği saptanmamıştır. *A. actinomycetemcomitans* patojeni için ise, kuersetinden sonra diğer fitokimyasalların



Şekil 1. Agar kuyucuk yöntemine göre fitokimyasalların oluşturduğu zon çapları (mm). Pg: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, Pi: *Prevotella intermedia* ATCC 25611, Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718. AP: Apigenin, HY: Hidroksitirozol, KT: Kuersetin, GA: Gallik asit, KM: Kurkumin, LT: Luteolin, PG: Pirogallol, AMK: Amoksisilin (20 µg/ml).

Tablo 2. Gıda fitokimyasallarının periodontal patojenler için MİK ve MBK Değerleri (mg/ml).

Fitokimyasal	Test Aralığı (mg/ml)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277		<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611		<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718	
		MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
Apigenin	3-0.01	3	3	0.375	0.75	1.5	1.5
Hidroksitirozol	3-0.01	0.75	1.5	>3	>3	>3	>3
Kuersetin	3-0.01	0.187	0.375	0.046	0.093	0.046	0.093
Gallik asit	3-0.01	0.75	1.5	0.75	1.5	0.187	0.375
Kurkumin	3-0.01	0.75	1.5	0.046	0.093	>3	>3
Luteolin	2-0.01	0.5	1	0.125	0.25	0.5	1
Pirogallol	3-0.01	3	3	3	3	0.375	0.75
DMSO (%)	32-0.50	4	8	4	8	4	8
Amoksisilin (mg/ml)	0.04-0.0015	0.01	0.01	0.005	0.005	0.01	0.01

MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu, MBK: Minimum bakterisidal konsantrasyonu

antimikrobiyal etkinlikleri sırasıyla, gallik asit>pirogallol>luteolin> apigenin olarak bulunmuştur. Hidroksitirozol ve kurkuminin kullanılan doz aralığında (3-0.01 mg/ml) bu patojen üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermediği saptanmıştır. Çalışmada, %4 ve daha alt dozlardaki DMSO'nun patojenler üzerinde inhibisyon etkisi bulunmamıştır. Patojenlerin antibiyotik duyarlılıkları ise *A. actinomycetemcomitans* < *P. gingivalis* < *P. intermedia* olarak belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Fitokimyasallar, sebze, meyve, tane, tahıl, baklagil, baharat gibi gıdalarda bulunan tek başına besin özelliği taşımayan kimyasal maddelerdir⁽¹³⁾. Bu maddeler açısından zengin beslenmenin kanser, inflamasyon, kardiyovasküler ve metabolik hastalık risklerini azalttığı bilinmektedir⁽¹⁴⁾. Bunlar antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı enfeksiyon hastalıklarına karşı da kullanılmaktadır⁽¹⁵⁾. Ülkemizde yapılmış olan bitkisel kökenli

bişiklerin antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili Akkoç ve ark.⁽¹⁶⁾ ve Şimşek⁽¹⁷⁾'in yaptığı çalışmalarda, bitkisel kökenli ilaçlara karşı mikroorganizmaların direnç geliştirmesinin daha zor olduğu, bitkisel ürünlerin tedavi amaçlı kullanım maliyetinin kimyasal ilaçlara göre daha düşük olduğu, sentetik kökenli maddelerin vücut üzerine olumsuz etkilerinin bitkisel ürünlerin kullanımı ile azalabileceği veya ortadan kaldırılabileceği belirtilmiştir. Bu nedenlerden dolayı bitkisel bişiklerin antimikrobiyal tedavilerdeki başarısı ve/veya koruyucu rolüne yönelik yapılan çalışmaların ülkemizde gittikçe önem kazandığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda ise, periodontal patojenlerine karşı gıdalarda etken madde olarak bulunan fitokimyasalların (kuersetin, kurkumin, apigenin, pirogallol, gallik asit, luteolin ve hidroksitirozol) in vitro antimikrobiyal potansiyelleri ortaya çıkarılmıştır. Literatürde çalışmamızda kullanılan bazı fitokimyasalların (kuersetin, kurkumin, pirogallol, gallik asit ve/veya apigenin) bazı periodontal patojenler ve karyojenik bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivitesini gösteren çalışmalar mevcuttur^(18,19-24). Kuersetin ve kurkumin fitokimyasallarının periodontal patojenler üzerine antimikrobiyal aktivitesi önceden farklı araştırmacılar tarafından^(17-22,24) belirlenmiş olmasına rağmen, çalışmamızdaki luteolin ve hidroksitirozol fitokimyasallarının antimikrobiyal potansiyelleri mevcut periodontal patojenler için ilk kez araştırılmıştır.

Çalışmamızda, tüm periodontal patojenler üzerinde en etkili fitokimyasal hem agar kuyucuk difüzyon hem de mikrodilüsyon yönteminde kuersetin olarak belirlenmiştir. Literatürde diğer araştırmacıların⁽¹⁸⁻²⁰⁾ yaptıkları çalışmalarda da, *P. gingivalis* ve *A. actinomycetemcomitans* suşları üzerinde kuersetinin antimikrobiyal etkinliği belirlenmiş ve araştırmacıların deney sonuçları bizim sonuçlarımızla uyumlu bulunmuştur. Shu ve ark.⁽²⁰⁾'nin yaptığı çalışmada, kuersetinin

P. intermedia bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi (MİK: 4 mg/ml, MBK: 16 mg/ml), bulduğumuz deney sonucundan (MİK: 0.046 mg/ml, MBK: 0.093 mg/ml) farklılık göstermektedir. Bu araştırmacılar, kuersetinin antimikrobiyal etkinliğini agar dilüsyon yöntemiyle saptamışlardır. Bu nedenle deney sonuçları arasındaki farklılığın özellikle kullanılan yöntem farkından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Izui ve ark.⁽²⁴⁾'nin periodontopatojen bakterileri üzerinde kurkuminin doza bağlı olarak antibakteriyel etkili olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamızda da, *A. actinomycetemcomitans* hariç diğer patojenler üzerinde kuersetinden sonra en iyi antimikrobiyal potansiyeli olan fitokimyasallarından birinin kurkumin olması araştırmacıların sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. Savita ve ark.'nin⁽²²⁾ yapmış olduğu başka bir çalışmada ise, kurkumin, *A. actinomycetemcomitans* bakterisinin başka bir suşunda (ATCC 29523) mikrodilüsyon yöntemiyle antimikrobiyal aktivite (MİK: 0.2 µg/ml) gösterirken, kullandığımız suş (ATCC 43718) üzerinde 3 mg/ml konsantrasyonda etkili olmamıştır. Ayrıca çalışmamızda kullanılan bakteri suşları üzerine kuersetin, kurkumin, pirogallol, gallik asit ve apigeninin mikrodilüsyon sonuçları diğer araştırmacıların^(18-20,23,24) buldukları sonuçlardan da farklılık göstermektedir. Bu durum deneysel koşulların farklılığı, aynı türün farklı suşlarının farklı özellikler göstermesi gibi nedenlerden kaynaklanabilir.

Çalışmamızda, bakteriler üzerinde DMSO'nun etkisi de test edilmiş, %4 ve altındaki DMSO konsantrasyonlarının bakterileri inhibe edici bir etkisinin olmadığı görülmüştür⁽⁹⁾. Bu sonuçlar, Porto ve ark.⁽²⁵⁾'nin yapmış olduğu çalışmayla uyumlu bulunmuştur. Literatürde periodontal patojenlerin farklı suşlarıyla yapılmış diğer araştırmalarda^(18,26,27) farklı orandaki (%1, %2.5 ve %10) DMSO konsantrasyonlarının bu bakteriler üzerinde etkisiz olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda, 3 mg/ml konsantrasyonundaki apigenin ve pirogallol *P. gingivalis* ve/veya *P. intermedia* karşı agar kuyucuk difüzyon yönteminde antimikrobiyal aktivite göstermezken, mikrodilüsyon yönteminde aynı dozda bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkili bulunmuştur. Literatürdeki^(28,29) periodontal ve oral patojen bakterilerin antimikrobiyal aktivite sonuçlarında da bulgularımızdaki gibi farklılıklar mevcuttur. Diğer araştırmacıların^(28,29) bulgularına paralel olarak çalışmamızda da elde ettiğimiz sonuçlar mikrodilüsyon yönteminin agar kuyucuk yöntemine göre daha güvenilir olduğunu göstermektedir. Çünkü bu iki yöntem arasındaki farklılık, fitokimyasalların agar ortamının içeriğine bağlanarak bu ortamda difüzyonlarının sınırlanabilmesinden, sıvı koşullarda ise mikrobiyal hücrelerin fitokimyasallar ile direkt temas etmesinden dolayı olabilir. Dolayısıyla mikrodilüsyon yöntemi agar difüzyona göre daha kesin sonuç verebilir.

Periodontal hastalıkların patogeneğinde birçok mikroorganizma türü tarafından oluşturulan biyofilm tabakası birincil etken olduğundan bu hastalıkların tedavisinde amoksisilin, amoksisilin-metronidazol ve amoksisilin-klavulanik asit kombinasyonu gibi geniş etki spektrumlu antibiyotikler yeğlenmektedir^(30,31). Çalışmamızdan elde edilen veriler fitokimyasalların patojenler üzerine amoksisilin antibiyotiği kadar düşük dozlarda etkin olmasa da belirgin bir antimikrobiyal potansiyele sahip olduğunu in vitro olarak ortaya koymaktadır. Bu nedenle periodontal hastalıkların tedavisinde, bu fitokimyasalların içeren gıdaların tüketiminin antibiyotik tedavisine ilave edilmesinin uygun ve yararlı olacağı düşünülmektedir.

Dental biyofilm gelişiminin kontrolü periodontal hastalık oluşumunu önleyebilir. Dental biyofilm oluşumunun engellenmesinde fenol türevleri ve doğal bileşikler de etkili olmaktadır⁽³²⁾. Yamanaka ve ark.⁽³³⁾, yaban mersinin polifenol fraksiyonlarının *Porphyromonas gingivalis* pato-

jeni üzerine antibiyofilm etkisini araştırmış ve bu fraksiyonların bu patojen üzerinde önemli oranda antibiyofilm etkili olduğunu saptamışlardır. Gursoy ve ark.⁽³⁴⁾ ise *Satureja hortensis* L. uçucu yağının periodontal bakteriler üzerinde kullanılan diğer uçucu yağlara göre daha güçlü bir antibiyofilm aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Teanpaisan ve ark.⁽³⁵⁾ ise Hindistan ve Tayland'da tropik alanlarda yaygın bulunan *Artocarpus lakoocha* bitki ekstresinin doza ve zamana bağlı olarak oral biyofilmi eradike edebildiğini saptayarak, bu ekstrenin oral patojenler üzerinde potansiyel bir antibiyofilm ajanı olarak rol oynadığını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, literatürde bulunan bitkisel kökenli bileşiklerin periodontal patojenlere karşı in vitro antimikrobiyal ve antibiyofilm çalışmalarına ilave olarak, çalışmamızda kullanılan gıda kaynaklı fitokimyasalların periodontal patojenlerin inhibisyon mekanizmalarına yönelik etkilerinin ileride daha detaylı araştırılması ve buna ilaveten periodontal hastalıkların tedavisi ve önlenmesinde bu fitokimyasalların etkin kullanımlarını belirlemek için daha ileri boyutta hücresel düzeyde in vivo çalışmalar yapılması önerilmektedir.

Teşekkür

Bu araştırmanın gerçekleşmesine finansal destek veren Gazi Üniversitesi BAP birimine (Proje No: 21/2015-01) proje yürütücüsü ve araştırmacıları olarak teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Secerli Dürer T. Periodontal hastalıklar. *Barnat*. 2014;8(1):34-7.
2. Buset SL, Walter C, Friedmann A, Weiger R, Borgnakke WS, Zitzmann NU. Are periodontal diseases really silent? A systematic review of their effect on quality of life. *J Clin Periodontol*. 2016;43(4):333-44. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12517>
3. Doğan M, Baysal B. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen anaerob bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2010;

- 44(2):211-9.
4. Palombo EA. 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*. 2011;2011:680354 .
<https://doi.org/10.1093/ecam/nep067>
 5. Gürcan Ş, Ünlü S, Kuloğlu F, Karadenizli A, Kuşkucu M. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* kaynaklı olası enfektif endokardit olgusuna mikrobiyolojik yaklaşım. *Mikrobiyol Bul*. 2016;50(2):315-21.
<https://doi.org/10.5578/mb.10803>
 6. Bhuvaneshwari P. Antioxidants in oral healthcare. *J Pharm Sci & Res*. 2014;6:206-9.
 7. Çiçek B. Fitokimyasallar ve immün sistem. *Türkiye Klinikleri J Nutr Diet-Special Topics*. 2016;2(2):36-41.
 8. Göncüoğlu M. Patojen bakterilerde antibiyotik direnç profili. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*. 2012;3(3):77-83.
 9. Bali EB, Akca, G, Erdönmez, D, Erkan Türkmen, K, Sağlam, N. Gıdalardaki fitokimyasalların periodontal patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitelerinin in vitro değerlendirilmesi. *Gıda, Metabolizma&Sağlık: Biyoaktif Bileşenler ve Doğal Katkılar Kongresi*, 28 Kasım 2016, İstanbul. Kongre Kitabı, 2016:34-8.
 10. Bali EB, Akca G, Erkan Türkmen K, Erdönmez D, Sağlam N. Gıda (Poli) fenollerinin periodontal patojen *Prevotella intermedia* ATCC 25611 üzerine inhibisyonu. *Turk J Biochem*. 2016;41(Suppl 3):P035.
 11. Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol*. 2000;45(2):141-8.
[https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(99\)00117-X](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(99)00117-X)
 12. Zgoda J, Porter J. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharm Biol*. 2001;39(3):221-5.
<https://doi.org/10.1076/phbi.39.3.221.5934>
 13. Dündar Y. Fitokimyasallar ve sağlıklı yaşam. *Kocatepe Tıp Derg*. 2001;2(2):131-8.
 14. Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci*. 2016;8:33-42.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>
 15. Petti S, Scully C. Polyphenols, oral health and disease: A review. *J Dent*. 2009;37(6):413-23.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.02.003>
 16. Akkoc N, Akcelik M, Haznedaroğlu IC, et al. In vitro anti-bacterial activities of Ankaferd medicinal plant extract. *Turk Klinikleri J Med Sci*. 2009;29(2):410-5.
 17. Şimşek M. Arum dioscoridis ekstrelerinin çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi. *Turk J Clin Lab*. 2013;4(1):66-70.
 18. Shahzad M, Millhouse E, Culshaw S, Edwards CA, Ramage G, Combet E. Selected dietary (poly) phenols inhibit periodontal pathogen growth and biofilm formation. *Food Funct*. 2015;6(3):719-29.
<https://doi.org/10.1039/C4FO01087F>
 19. Geoghegan F, Wong R, Rabie A. Inhibitory effect of quercetin on periodontal pathogens in vitro. *Phytother Res*. 2010;24(6):817-20.
 20. Shu Y, Liu Y, Li L, et al. Antibacterial activity of quercetin on oral infectious pathogens. *Afr J Microbiol Res*. 2011;5(30):5358-61.
 21. Mohammed NA, Habil NY. Evaluation of antimicrobial activity of curcumin against two oral bacteria. *ACIS*. 2015;3(2-1):18-21.
<https://doi.org/10.11648/j.acis.s.2015030201.14>
 22. Savita AM, Dawra C, Bhat K. An in vitro evaluation of antibacterial activity of curcumin against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *World J Dent*. 2015;6(1):16-9.
<https://doi.org/10.5005/jp-journals-10015-1306>
 23. Cha S-M, Kim G-U, Cha J-D. Synergistic antimicrobial activity of apigenin against oral pathogens. *IJOER*. 2016;2(1):27-37.
 24. Izui S, Sekine S, Maeda K, et al. Antibacterial activity of curcumin against periodontopathic bacteria. *J Periodontol*. 2016;87(1):83-90.
<https://doi.org/10.1902/jop.2015.150260>
 25. Porto TS, Rangel R, Furtado NA, et al. Pimarane-type diterpenes: antimicrobial activity against oral pathogens. *Molecules*. 2009;14(1):191-9.
<https://doi.org/10.3390/molecules14010191>
 26. Fani M, Kohanteb J. Inhibitory activity of *Aloe vera* gel on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *J Oral Sci*. 2012;54(1):15-21.
<https://doi.org/10.2334/josnusd.54.15>
 27. Herrera Herrera A, Franco Ospina L, Fang L, Díaz Caballero A. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mutans* to antibacterial effect from *Mammea americana*. *Adv Pharmacol Sci* 2014;2014:384815.
 28. Shafiei Z, Shuhairi NN, Md Fazly Shah Yap N, Harry Sibungkil C-A, Latip J. Antibacterial activity of *Myristica fragrans* against oral pathogens. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:825362.
<https://doi.org/10.1155/2012/825362>
 29. Shetty S, Thomas B, Shetty V, Bhandary R, Shetty RM. An in-vitro evaluation of the efficacy of garlic extract as an antimicrobial agent on periodontal pathogens: A microbiological study. *Ayu*. 2013;34(4):445-51.
<https://doi.org/10.4103/0974-8520.127732>
 30. Gümüş P, Buduneli N. Antibiyotikler periodontal tedavide ne zaman ve nasıl kullanılmalı? *Balikesir Saglik Bil Derg*. 2014;3(2):122-5.
 31. Tüter G. Periodontal tedavide antibiyotiklerin kullanımı. *GÜ Dişhek Fak Derg* 2006;23(1):55-9.
 32. Tardugno R, Pellati F, Iseppi R, Bondi M, Bruzzesi G, Benvenuti S. Phytochemical composition and in vitro screening of the antimicrobial activity of essential oils on oral pathogenic bacteria. *Nat Prod Res*. 2018;32(5):544-51.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1329730>
 33. Yamanaka A, Kouchi T, Kasai K, Kato T, Ishihara K, Okuda K. Inhibitory effect of cranberry polyphenol on biofilm formation and cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res*. 2007;42(6):589-92.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.00982.x>
 34. Gursoy UK, Gursoy M, Gursoy OV, Cakmakci L, Könenen E, Uitto V-J. Anti-biofilm properties of *Satureja hortensis* L. essential oil against periodontal pathogens. *Anaerobe*. 2009;15(4):164-7.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.02.004>
 35. Teanpaisan R, Senapong S, Puripattanavong J. In vitro antimicrobial and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* (Moraceae) extract against some oral pathogens. *Trop J Pharm Res*. 2014;13(7):1149-155.
<https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i7.20>