

Kurt üzümü (Goji berry) özütünün, lityum klorür birlikte kullanımının Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri popülasyonu üzerine etkilerinin in vitroda araştırılması

Mine ERGÜVEN^{1*}

Enes ÇILDIR²

Melike Özdemir CENGİZ³

Geliş tarihi/Received:22.07.2022

Düzeltilerek geliş tarihi/Received in revised form: 27.02.2023

Kabul tarihi:07.03.2023

DOI: 10.17932/IAU.ABMYOD.2006.005/abmyod_v17i66005

Öz

Amacımız antibakteriyel etkilere sahip, besin takviyesi olarak sıkça tercih edilen kırmızı kurt üzümü (KÜ) ile bipolar bozukluk ve kanser tedavisinde uzun yıllar yaygın kullanılan ve halen güvenlik sınırları sorgulanan lityum klorürün (LiCl) birlikte kullanımının, birbirlerinin antibakteriyel etkilerini Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerde in vitroda nasıl etkileyebileceğini araştırmaktır. Bu çalışmada kurt üzümü meyvesinin tamamının özütü çıkarılarak çalışmada kullanıldı. KÜ ve LiCl, *Escherichia coli* (*E.coli*) ve *Salmonella typhi* (*S. typhi*) gram-negatif bakterileri ile *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) Gram-pozitif bakteri üzerinde test edildi. KÜ ve LiCl'ün her bir bakteri soyundaki minimum inhibitör konsantrasyon 90 (MİK90) değeri makrodilüsyon testi ve her bir bakteriye duyarlı olan antibiyotiklerin MİK90 değerleri ise mikrodilüsyon testi ile saptandı. Gruplar kontrol (K), kurt üzümü (KÜ), lityum klorür (LiCl), kombinasyon (G+LiCl) ve antibiyotik grupları (Amoksisilin, Amfisilin, Vankomisin) olarak belirlendi. Bakteri kolonilerinin sayısı agar-dilüsyon testi kullanılarak değerlendirildi. Her test grubu (n:3) 3 defa tekrar edildi. Biyoistatistik analiz Anova Testi ve Tamhane's T2 post-hoc testi kullanılarak yapıldı. KÜ'nün MİK90 değerleri sırasıyla *E.coli*'de, *S.typhi*'de ve *S.aerus*'da, ≥ 50 mg/ml, ≥ 50 mg/ml ve ≥ 100 mg/ml olarak belirlendi. LiCl'ün MİK90 değerleri sırasıyla *E.coli*'de, *S.typhi*'de ve *S.aerus*'da ≥ 100 mM, ≥ 150 mM ve 500 mM olarak belirlendi. Vankomisinin *S.aerus*'da

1Prof. Dr., İstanbul Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D., İstanbul, Türkiye, Tel: 0212 411 61 00-57201, mineerguven@aydin.edu.tr; ORCID: 0000-0002-6583-0684

2 M.Sc, İstanbul Aydın Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, enescldr58@gmail.com, ORCID: 0000-0002-9705-3197

3 Biyolog, İstanbul Aydın Üniversitesi, SHMYO, İstanbul, Türkiye, Tel: 0212 411 61 00, melikeozdemircengiz@aydin.edu.tr; ORCID: 0000-0002-6228-7014

Goji berry'nin, lityum klorür birlikte kullanımının gram-pozitif ve gram-negatif bakteri popülasyonu üzerine etkilerinin araştırılması

$\geq 1.5 \mu\text{g/ml}$, Amoksisilin *S.typhi*'de $\geq 10 \mu\text{g/ml}$ ve Amfisilin *E.coli*'de $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ MİK90 değerleri saptandı. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında tüm grupların, bakteri koloni sayılarını azalttığı görüldü. Koloni sayıları sırasıyla K, G, LiCl, G+LiCl gruplarında *E.coli*'de 300, 79, 72, 71; *S. typhi*'de 300, 67, 78, 77 ve *S. aureus*'da 300, 116, 102, 101 olarak belirlendi. LiCl'e en dirençli bakterinin *S. aureus*, en duyarlı bakterinin ise *E.coli* olduğu saptandı. Bu çalışmada LiCl ve KÜ'ün birlikte kullanımının, tek olarak kullanımlarına göre daha fazla etkili olmadığı hatta birbirlerinin etkilerini azalttığı saptandı.

Anahtar kelimeler: Kurt üzümü, goji berry, lityum klorür, antibakteriyel etki, gıda takviyesi

The investigation of the effects of goji berry extract in combination with lithium chloride on Gram-positive and Gram-negative bacteria populations *in vitro*

Abstract

Our aim was to investigate how the combined use of red goji berry (GB), which has antibacterial effects and is frequently preferred as a nutritional supplement, and lithium chloride (LiCl) which has been widely used for many years in the treatment of bipolar disorder and cancer, and whose safety limits are still questioned, affect the antibacterial effects of each other on Gram-positive and Gram-negative bacteria. The whole extract of goji berry fruit was extracted and used in the study. GB and LiCl were tested on Escherichia coli (E.coli) and Salmonella typhi (S. typhi) as Gram-negative bacteria and Staphylococcus aureus (S. aureus) as Gram-positive bacteria. The minimum inhibitory concentration 90 (MIC90) values of GB and LiCl on each bacterial strain were determined by the macrodilution test, and the MIC90 values of the antibiotics to which sensitive to each bacteria were determined by the microdilution test. Groups were determined as control (C), goji berry (GB), lithium chloride (LiCl), the combination (GB+LiCl) and the antibiotic groups (Amoxicillin, Ampicillin, Vancomycin). The number of bacterial colonies was evaluated by using the agar-dilution test. Each test group (n:3) was repeated 3 times. Biostatistical analysis was evaluated using Anova Test and Tamhane's T2 post-hoc test. MIC90 values of GB were determined as ≥ 50 mg/ml, ≥ 50 mg/ml and ≥ 100 mg/ml in E.coli, S.typhi and S.aureus, respectively. MIC90 values of LiCl were determined as ≥ 100 mM, ≥ 150 mM and ≥ 500 mM in E.coli, S.typhi and S.aureus, respectively. MIC90 value of Vancomycin was ≥ 1.5 μ g/ml in S.aureus, Amoxicillin ≥ 10 μ g/ml in S.typhi, Ampicillin ≥ 8 μ g/ml E.coli. When compared to the control group, it was seen that all groups decreased the number of bacteria colonies. The colony numbers were determined as 300, 79, 72, 71 in E.Coli, 300, 67, 78, 77 in S. typhi, and 300, 116, 102, 101 in S. aureus for C, GB, LiCl, GB+LiCl groups, respectively. It was determined that the most resistant bacteria to LiCl was S. aerus, and the most sensitive bacteria to LiCl was E.coli. In this study, it was determined that the combined use of LiCl and GB was not more effective than their single use, and they reduced the effects of each other.

Keywords: Wolf berry, goji berry, lithium chloride, antibacterial effect, food supplement

Giriş

Bağırsak mikrobiyotası, insanların ve hayvanların sindirim kanallarında yaşayan karmaşık bir mikroorganizma topluluğudur. İnsanlarda, bağırsak mikrobiyotası vücudun diğer bölümlerine kıyasla en fazla sayıda ve türde mikroorganizmaya sahiptir (Quigley, 2013; Gomaa, 2020). Doğumdan hemen sonra sindirim sistemini kolonize eden bakteri, virüs ve bazı ökaryotlar dahil binlerce mikroorganizmadan oluşmaktadır (Passos ve Moraes-Filho, 2017; Gomaa, 2020).

Bağırsak mikrobiyotası, 50'den fazla farklı filumda dağılmış 1500'den fazla tür içermektedir (Robles-Alonso ve Guarner 2013; Gomaa, 2020). Bacteroidetes ve Firmicutes'in ardından Proteobacteria, Fusobacteria, Tenericutes, Actinobacteria ve Verrucomicrobia'nın en baskın filum olduğu ve insanlarda toplam mikrobiyal popülasyonun %90'ını oluşturduğu bildirilmiştir (Jethwani ve Grover 2019; Gomaa, 2020). Bağırsak mikrobiyota bileşimini ve işlevini değiştirebilecek birkaç faktör vardır. Bu faktörler arasında konak genetiği, beslenme, yaş (Odamaki ve ark., 2016; Gomaa, 2020), doğum şekli (Nagpal ve ark., 2017; Gomaa, 2020) ve antibiyotikler (Hasan ve Yang, 2019; Gomaa, 2020) bulunmaktadır.

Bağırsak mikrobiyotasının insan vücudunda, mukozal yüzeyleri kolonize edip ve farklı antimikrobiyal maddelerin oluşturulmasını destekleyip patojenlerden korunmayı desteklemek, bağışıklık sistemini güçlendirmek (Mills ve ark., 2019; Gomaa, 2020), sindirim ve buna bağlı metabolizma işleyişini devam ettirmek (Rothschild ve ark., 2018; Gomaa, 2020), epitelyal hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını kontrol etmek (Wiley ve ark., 2017; Gomaa, 2020), insülin direncini değiştirmek ve salgılanmasını etkilemek (Kelly ve ark., 2015a,b; Gomaa, 2020), beyin-bağırsak iletişimini etkileyerek konağın zihinsel ve nörolojik işlevlerini artırmak (Zheng ve ark., 2019; Gomaa, 2020) dahil olmak üzere birçok önemli işlevi bulunmaktadır. Bu sayılan nedenlerden dolayı bağırsak mikrobiyotası, normal bağırsak fizyolojisi ve sağlığının korunmasında dolayısıyla genek olarak insan vücut sağlığının korunmasında önemli bir rol oynar.

Bağırsak mikrobiyota popülasyonunda meydana gelen bozuklukların inflamatuvar bağırsak hastalıkları (IBH) (Nishino ve ark., 2018; Gomaa, 2020; Gallo ve ark., 2020) gibi çeşitli insan enfeksiyonları, obezite ve diyabet (Karlsson ve ark., 2013; Gomaa, 2020), alerji (Bunyavanich ve ark., 2016; Gomaa, 2020), otoimmün hastalıklar (Chu ve ark., 2017; Gomaa, 2020) ve kardiyovasküler hastalıklar (Jie ve ark., 2017; Gomaa, 2020) ile bağlantılı olduğu görülmüştür.

Gıda kaynaklı birçok enfeksiyonel-inflamatuar hastalık direkt bağırsak ile bağlantılı olup bağırsağın patolojik bakteri, virüs, parazitler, mantar, küf ve protozoalar ile kontaminasyonu sonucu görülmektedir (Gallo ve ark., 2020). Bu kontaminasyonlarda büyük rol oynayan, yaygın olarak saptanan ajanlar ise bakterilerdir. Bağırsakta hem patojenik olmayan yararlı bakteriler hem de patojenik bakteriler bulunabilmektedir. Patojenik olmayan yararlı bakteriler patojenik bakterilerin üremesini kısıtlar, metabolizma çalışmasını direkt etkileyen B3 vitamini gibi bazı vitaminlerin sentezi işlevlerini gerçekleştirir. Örneğin patojenik bakterilerden Salmonella çiftlik hayvanlarından elde edilen yumurta ve etlerde; S. aureus et ürünleri, kremler, süt, balık ürünlerinde ve Escherichia coli suşları özellikle dışkı ile kontamine olmuş yiyecekler ile suda görülebilmektedir (Gallo ve ark., 2020; (Gebayel ve ark., 2022). İnsanların doğumlarından ölümlerine kadar patojenik olmayan yararlı bakteriler kadar bu patojenik bakteriler ile kontaminasyonu da kaçınılmazdır. Ancak buradaki temel olan can alıcı nokta patojenik ve patojenik olmayan yararlı bakteri sayısı arasındaki dengedir. Bu dengeyi de çok etkin olarak değiştiren ilk sırada yer alan önemli faktörlerden biri hiç tartışmasız direkt bağırsak bağlantısı nedeniyle beslenme olarak düşünülmektedir. Günümüzde bu denge, gıda alımı yanında ek olarak probiyotik ve prebiyotik takviyeler kullanılarak sağlanmaya çalışılmaktadır (Gebayel ve ark., 2022).

Yaygın olarak tercih edilen, sağlığa yararlı birçok farklı etkileri yanında prebiyotikler grubu altında da değerlendirilen Lycium barbarum latince adıyla kurt üzümü (Goji berry) meyvesi Solanaceae familyasında yer almaktadır (Yun ve ark., 2022; Amagase ve Farnsworth, 2011). Kurt üzümü, Asya’da 1000 yılı aşkın bir süredir yaygın bir sağlıklı olmaya yol açan gıda ve ilaç olarak tüketilmektedir. Meyve, akut apeks ve perikarp kırmızıdan koyu kırmızıya kadar iğ şeklindedir. Kurt üzümü kurutulabilir, taze meyve suyu üretimi için sıkılıp içilebilir veya şarap ve çay gibi çeşitli sağlıklı içeceklerin yapımında gelecekte kullanılmak üzere konsantre edilebilmektedir. (Amagase ve Farnsworth, 2011). Kurt üzümü meyvelerinin lipidler, proteinler, lifler, C vitamini ve çeşitli mineraller (Pedro ve ark., 2019; Niro ve ark., 2017), fenolik bileşikler, polisakkaridler ve karotenoidler gibi besleyici olmayan biyoaktif bileşikler yönünden iyi bir besin kaynağı olduğu gösterilmiştir (Benchennouf ve ark., 2017; Mocan ve ark., 2018). Birçok in vitro, in vivo ve klinik çalışmalar, kurt üzümü meyvelerinin bazı sağlık yararlarının anlaşılmasına katkıda bulunmuştur (Donno ve ark., 2015; Mocan ve ark., 2018; Ruffo ve ark., 2017; Jiang ve ark., 2021). Kurt üzümünün çeşitli kanser tiplerini, uyku bozukluğunu, göz kuruluğunu, Parkinson Hastalığı’nı, hiperlipidemi ve buna bağlı hastalıkları önleme ve tedavi edici yönleri olduğu çalışmalarda

gösterilmiştir (Ma ve ark., 2019; Amro ve ark., 2018; Jiang ve ark., 2021, Kan ve ark., 2020). Buna ek olarak, kurt üzümünün çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler (Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Bacillus subtilis, Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa) ve Salmonella typhimurium) üzerine de antibakteriyel etkileri olduğu yapılan çalışmalarda saptanmıştır (Mocan ve ark., 2015; Mocan ve ark., 2014; Ilić ve ark., 2020).

Lityum (Li), periyodik tablonun 2. periyodunun 1. grubunda yer alan, atom numarası 3 olan bir metaldir (Wong ve ark., 2020). Li gıdalarda değişken miktarlarda bulunmaktadır. Lityumun bulunduğu birincil besin kaynakları tahıllar ve sebzeler olmakla birlikte bazı bölgelerde lityum içme suyunda da önemli miktarlarda saptanmıştır. İnsanların diyetle aldıkları lityum miktarı bölgeye ve tüketilen gıdaların türüne göre değişmektedir (Schrauzer, 2002). Lityum tuzları bipolar bozukluk tedavisinde 60 yıldan fazla süredir klinikte aktif olarak kullanılmaktadır (Licht, 2012; Won ve ark., 2017). Bunun yanında lityum ve lityum klorür (LiCl) gibi lityum tuzları enterovirüs enfeksiyonu, Parkinson Hastalığı, radyasyon hasarına bağlı bozukluklar, romatoid artrit, çeşitli kanser tipleri gibi çok sayıda hastalık için kullanılmaya ve denenmeye devam edilmektedir (Najafi, 2021; Hung ve ark., 2014; Wen ve ark., 2019; Zanni ve ark., 2015; Erguven ve ark., 2016). Lityumun etkisini kanatsız (Wnt=Wingless+int)-katenin sinyal yolu, adenilat siklaz, inositol döngüsü inhibisyonu da dahil olmak üzere çeşitli sinyal yolları üzerinden gerçekleştirmektedir (Erguven ve ark., 2016; Aras ve ark., 2016; Wen ve ark., 2019).

Çalışmalarda lityum klorürün hem antibakteriyel etkilerine hem de antiviral etkilerine değinilmiştir (Rybakowski, 2022; Murru ve ark., 2020; Shokeen ve ark., 2021; Qian ve ark., 2018; Makola ve ark., 2021; Gu ve ark., 2022; Liechti ve ark., 2014; Chen ve ark., 2013; Cebrián ve ark., 2014; Stachelska, 2015; Tsao ve ark., 2015). LiCl ile yapılan bir çalışmada Bacillus subtilis (B. subtilis), Staphylococcus aureus (ATCC 25923), Pseudomonas aeruginosa kullanılmış ve LiCl'ün farklı konsantrasyonlarına bağlı olarak bakteri duyarlılığının nasıl değiştiği araştırılmıştır (Gu ve ark., 2022). Yaptıkları bu çalışma sonucunda LiCl'ün bu bakteriler üzerinde inhibisyon etkisinin LiCl'ün farklı konsantrasyonlarına bağlı değiştiği ve S. aureus'un LiCl'e karşı en dirençli bakteri olduğu saptanmıştır (Gu ve ark., 2022). Yapılan başka bir çalışmada LiCl'ün pnömokok menenjitisi etkeni Streptococcus pneumoniae'ye karşı antibakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır (Liechti ve ark., 2014). Diğer başka iki çalışmada ise LiCl'ün glikojen sentaz kinaz-3 alfanın (GSK-3 α) inhibisyonu üzerinden gerçekleştirdiği konak

savunma sistemi aktivasyonu ile Grup A Streptococcus (GAS) ve Salmonella enterica serovar Enteritidis (S. enteritidis) enfeksiyonunu azalttığı saptanmıştır (Liechti ve ark., 2014; Kogut ve ark., 2014). Bir intragastrik enfeksiyon modeli üzerinde yapılan çalışmada ise LiCl'ün Klebsiella pneumoniae (K. pneumoniae) çoğalmasını inhibe ettiği saptanmış ve buna ek olarak ilginç bir biçimde düşük dozlarda LiCl'ün de makrofajların bakterisidal aktivitesini kısmen arttırdığı da belirlenmiştir (Tsao ve ark., 2015). Bunun yanında başka bir çalışmada yüksek doz LiCl'ün bağırsakta makrofaj aktivasyonu üzerinden kolite neden olduğu gösterilmiştir (Lei ve ark., 2021). Bu antimikrobiyal çalışmalara ek olarak olarak kanser üzerine yapılan çalışmalarda da LiCl'ün konsantrasyona bağlı farklı etkiler gösterdiği hatta bifazik etkileri olduğu da görülmüştür. LiCl'ün bifazik etkisinde yüksek konsantrasyonda uygulanan LiCl'ün bazı kanser ve kanser kök hücrelerinin sayısını azalttığı, düşük konsantrasyondaki LiCl'ün kanser hücrelerinin çoğalmasını artırdığı görülmüştür (Erguven ve ark.,2016; Suganthi ve ark., 2012; Welshons ve ark., 2015).

Hem prebiyotik etkili hem de antibakteriyel etkili kurt üzümü ile antibakteriyel etkili lityum klorürün birlikte kullanımının patojen bakteriler üzerine etkisi olup olmadığı, bu birlikte kullanımın bir etkisi varsa bu etkinin total antibakteriyel aktiviteyi artırıp artırmadığı şimdye kadar herhangi bir çalışmada gösterilmemiştir. Bu çalışmada amacımız antibakteriyel ve prebiyotik etkileri gösterilmiş, tatlı tadı ile lifli özelliği ve yüksek antioksidan kapasitesi nedeniyle çok fazla tercih edilen, bazı hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir besin takviyesi olan kırmızı kurt üzümü ile diğeri psikiyatrik bozukluklar ve çeşitli kanser türleri dahil birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılan lityum klorürün birlikte kullanımının bağırsak mikrobiyotasına gıda kontaminasyonu ile yerleşebilen Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler üzerine antibakteriyel etki yönünü aydınlatmaktır.

Materyal ve Metod

Bu çalışma prospektif deneysel bir çalışma olup İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi. Bu çalışmada kullanılan bakteriler Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'dan (ATCC) İstanbul Aydın Üniversitesi (İAÜ) ABMYO Gıda Teknolojisi Program Başkanı Dr. Öğretim Üyesi Ayla Ünver Alçay'ın projeleri için alındı. Bakteriler mevcut çalışma için Dr. Öğretim Üyesi Ayla Ünver Alçay tarafından tarafımıza hibe edildi. Bu bakteriler, İAÜ Gıda Teknolojisi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda seçici kültürlerde üretilerek doğrulama testleri gerçekleştirildi. Buna

göre mevcut çalışmada kullanılan Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteri soyları E.coli (ATCC 25922), S. typhi (ATCC 39183) ve S. aureus'dur (ATCC 14222). Kurt üzümü ve lityum klorürün her bir bakteri soyundaki minimum inhibitör konsantrasyon 90 (MİK90) değeri makrodilüsyon testi ile bakterilerin duyarlı oldukları antibiyotiklerdeki MİK90 değerleri ise mikrodilüsyon testi ile değerlendirildi.

Test edilecek kurt üzümü ve lityum klorürün hazırlanması

Deneyde kullanılan gıda takviyesi kurt üzümü, Lactone Life (Türkiye) marka olup 1 kapsül 650 mg'dır. Bu kapsül içinde Türkiye'de yetiştirilmiş olan kırmızı KÜ'den 600 mg bulunmaktadır, 50 mg ise diğer bileşenlere aittir. KÜ stok çözeltisi ve dilüsyonları steril, bidistile su kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiler, 0.22 mikron enjektör filtre kullanılarak steril edildi. Kurt üzümünün 0-600 mg/ml arası (0, 0.59, 1.18, 2.35, 4.69, 9.38, 18.75, 37.5, 75, 150, 300, 600 mg/ml) konsantrasyonları test edildi. Stok çözeltiler yukarıda belirtilen dilüsyon konsantrasyonlarının 1 ml'de bulunacağı şekilde hazırlandı. LiCl (Sigma-Aldrich, Almanya) steril, bidistile suda çözülerek stok solüsyon ve seri dilüsyonlar hazırlandı. LiCl'ün 0-500 mM arası (0, 0.1, 10, 100, 500 mM) konsantrasyonları çalışmada test edildi. Hazırlanan stok çözeltiler, yine 0.22 mikron enjektör filtre kullanılarak steril edildi.

Antibiyotiklerin hazırlanması

Kullanılan bakteri suşlarının duyarlılıklarına göre antibiyotikler seçildi: Amoksisilin (Largopen®), Amfisilin/Sulbaktam (Sulcid®), Vankomisin (Vancomax®). Largopen 500 mg tablet, ampisilinin bir analogu olan yarı-sentezik bir penisilin olan amoksisilin trihidrat içermektedir. Sulcid, 1 gr 1 flakon, ampisilin ve sulbaktam isimli aktif maddenin bileşimidir. Vancomax, her bir flakon 1000 mg vankomisine eşdeğer 1025.2 mg vankomisin hidroklorür içermektedir. Bu antibiyotiklerin sulu çözeltileri hazırlanarak uygulamalar yapıldı. Antibiyotiklerin 0-300 µg/ml arası (0, 0.15, 0.29, 0.57, 1.14, 2.28, 4.56, 9.13, 18.25, 36.5, 75, 150, 300 µg/ml) konsantrasyonları test edildi.

Bakteri inokülasyonunun hazırlanması

İnokülüm hazırlanmasında doğrudan koloni süspansiyon yöntemi kullanıldı. Ön deneylerde seçici besiyerleri ile izole edilerek dondurulan bakteriler çözülmüş ve Mueller-Hinton Agar'da çoğaltıldı. 24 saat inkübe edilmiş plaktan tek düsmüs koloniler seçilerek doğrudan tüp içindeki sıvı besiyerine aktarıldı ve McFarland 0.5 bulanıklığı standardına göre ayarlandı.

Dilüsyon testleri

-Tüp dilüsyon testi

Makrodilüsyonda 10 ml'lik test tüpleri ile tüp dilüsyon metodunda besiyeri olarak Mueller-Hinton Broth kullanıldı. Antibiyotiklerin, LiCl ve kurt özümün sıvı besiyerinde 10 ml'lik test tüpleri içinde iki kat azalan sulandırılmaları ayrı ayrı yapıldı. Tüpler yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru seri olarak sulandırıldı. Her bir bakteriye ait mikroorganizmanın standart bir inokulumu (1×10^8 kob/ml; McFarland 0.5) hazırlanıp antimikrobiyal ajanın çeşitli dilüsyonlarını içeren her bir tübe esit miktarlarda eklendi. Buna ek olarak antibiyotik içermeyen üreme kontrol tüpü ile bakteri eklenmemiş sadece besiyeri konmuş bir tüp de gruplara eklendi. Tüpler 37°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra bakteri üremesini gösteren bulanıklık yönünden çıplak gözle incelendi. Bulanıklık, besiyerindeki antimikrobiyal madde konsantrasyonunun bakteri üremesini inhibe etmediğini gösterdi. MİK, serinin gözle görülür üremenin engellendiği berrak olan ilk tüpteki antimikrobiyal maddenin konsantrasyonu olarak değerlendirildi. Bu tüpteki süspansiyon haldeki karışım, daha sonra Mueller-Hinton Broth Agar dökülmüş petrilere ekilerek ve mikropalakalara aktarılıp absorbans değerleri ölçülerek kontrolleri yapıldı. Ayrıca herbir tübün bulanıklığı da yine McFarland cihazında ve ELIZA okuyucuda ölçüldü. Kontamine olmuş tüpler, değerlendirmeye alınmadı.

-Agar dilüsyon testi

90x20 petri kaplarına 10 ml Mueller-Hinton Broth Agar döküldükten sonra test edilecek bakterinin yoğunluğu 0.5 McFarland bulanıklığına göre ayarlandı. Bu ayarlardan sonra inokulum, 1:10 oranında sulandırılarak 10^7 kob/ml sayı elde edilmiş ve bu bakteri süspansiyonundan mikropipet yardımıyla 2 ml alınarak öze yardımıyla petriye yayıldı. Bakteri sayısının ortalama 10^4 kob/ml olması istendi. Bakteri ekilen plakların 37°C'de 24 saat kalması ve koloni oluşturması beklendi. Her gruba ait koloni sayımı yapıldı ve 300 koloniye sahip petrilere test maddelerini uygulamak üzere deneye dahil edildi. Çeşitli konsantrasyonlarda dilüsyonları yapılmış sadece LiCl ile KÜ ve antibiyotikler bu petrilere 1 ml çözelti içerisinde tüm petriyi kaplayacak şekilde uygulandı. Sadece ağız olan boş petri kabı ile bakteriler bulunan ancak hiçbir uygulama yapılmamış ancak stress oluşturmak üzere sadece 1 ml su eklenmiş petri kapları kontrol grupları olarak değerlendirmeye alındı. İnkübasyon süreleri 24 saatlik aralıklar olarak belirlendi ve 24 saatten sonra koloniler sayıldı. Mantar ve diğer bakteriler ile kontamine olmuş petrilere değerlendirilmeye alınmadı. Mantar üreyen petrilere mikroskop

altında inceleme sonucunda belirlenmiş ve mantar ürettiği görülen petripler imha edildi. Farklı bakterilerin kontaminasyonu ise yine mikroskop ile inceleme sonucunda saptanan farklı koloni tipleri içeren petriplerden numune alınıp seçici besiyerlerine ekilip değerlendirilmesi sonucunda saptandı. Bu saptamadan sonra petripler imha edildi.

-Mikrodilüsyon testi

96-kuyucuklu mikropalakalar kullanıldı. Mikrodilüsyon yönteminde 96 kuyucuklu plakların her birine 95 µl besiyeri kondu, üzerlerine 5 µL 0.5 McFarland konsantrasyonunda bakterileri ilgili kuyucuklara ayrı ayrı ekildi. Son olarak kuyucuklara 100 µl, seri dilüsyon yöntemiyle konsantrasyonları ikişer kat azalan antibiyotikler sırasıyla eklendi. Toplam olarak her bir kuyucukta 200 µl karışım (Besiyeri + bakteri + antibiyotik) bulunmakta olup 96 kuyucuklu plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Bakteri gelişimi, bakteri yoğunluğunun optik olarak belirlenmesiyle değerlendirildi. Bakterilerin optik yoğunluğu 600 nm'de mikropalaka okuyucu kullanılarak ölçüldü.

İstatistiksel analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilks testi ile değerlendirildi. Tüm deneyler (n:3) 3 kez tekrarlandı ve elde edilen veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığı Anova (Two-way Anova) testi ve hangi grupta farklılık olduğu da Tamhane's T2 post-hoc testi kullanılarak değerlendirildi. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Tüp dilüsyon testi bulguları

Kurt üzümü and lityum klorürün 3 bakteride MİK90 değerleri Çizelge 1'de gösterildi (Çizelge 1).

Çizelge 1. Kurt üzümü ve lityum klorürün MİK90 değerleri

	Bakteri türü/Gruplar	Kurt üzümü (mg/ml)	Lityum klorür (mM)
1	E.coli (ATCC 25922)	≥ 50	≥ 100
2	S. typhi (ATCC 39183)	≥ 50	≥ 150
3	S.aureus (ATCC 14222)	≥ 100	≥ 500

Agar dilüsyon testi bulguları

Aşağıdaki çizelgede (Çizelge 2) gruplarda saptanan koloni sayılarındaki değişiklikler gösterildi:

Çizelge 2. Kurt üzümü ve lityum klorürün koloni sayıları üzerine yaptığı değişiklikler

	Grup/Bakteri Türü	K	KÜ	LiCl	KÜ +LiCl	P
1	<i>E.coli</i>	300±7 ^{g,l,k}	79±2 [*]	72±3 ^{*g}	71±2 ^{*g}	P<0.05
2	<i>S. typhi</i>	300±6 ^{g,l,k}	67±1 ^{*,l,k}	78±5 ^{*g}	77±3 ^{*g}	P<0.05
3	<i>S. aureus</i>	300±4 ^{g,l,k}	116±6 ^{*,l,k}	102±10 ^{*g}	101±5 ^{*g}	P<0.05

Koloni sayısı sonuçları ortalama±standart sapma (SD) olarak gösterildi. P<0.05, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. *, kontrole göre; g, kurt üzümüne göre; l, lityum klorüre göre; k, kurt üzümü ve lityum klorür kombinasyonuna göre istatistiksel anlamlılık simgesi olarak belirlendi. MİK90 değerleri kullanılarak tüm uygulamalar yapıldı.

Yukarıdaki çizelge incelendiğinde, kontrol grubuna göre bir kıyaslama yapıldığında tüm bakteri türlerinde, tekli ve kombinasyon şeklinde uygulanan tüm test maddelerinin koloni sayısını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü (p<0.05).

E.coli grubundaki değerlendirmede kontrol grubu ile yapılan kıyaslamada kombinasyon grubu en yüksek antibakteriyel etkiyi göstermiş (p<0.0000), sonra bunu tek başına LiCl grubu izlemiş (p<0.0000) ve en düşük antibakteriyel etkiyi de KÜ grubu (p<0.0000) göstermiştir. Ancak özellikle LiCl ile kombinasyon grubunun koloni azaltma oranı birbirine çok yakın olup birbiri ile kıyaslandığında ikisinin yaptığı koloni azaltma oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı

($p>0.05$). Tek başına LiCl kullanılması ile kombinasyon grubu uygulaması yapılması arasında bir fark yoktu. KÜ'nün etkisi ile LiCl ve kombinasyon grubu kıyaslandığında, KÜ'nün bakteri kolonisi azaltma oranı diğer iki grubun oranından biraz daha az ve değerler yakın olsa da aradaki fark her iki grup için istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P_{LiCl}<0.05$; $P_{KÜ+LiCl}<0.05$).

S. typhi grubunda yapılan değerlendirmede kontrol grubu ile yapılan kıyaslamada KÜ en yüksek antibakteriyel etkiyi göstermiş ($p<0.0000$), sonra bunu kombinasyon grubu izlemiş ($p<0.0000$) ve en düşük antibakteriyel etkiyi de LiCl grubu ($p<0.0000$) gösterdi. Ancak özellikle LiCl ile kombinasyon grubunun koloni azaltma oranı *E. coli*'de olduğu gibi birbirine çok yakın olup birbiri ile kıyaslandığında ikisinin yaptığı koloni azaltma oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Tek başına LiCl kullanılması ile kombinasyon grubu uygulaması yapılması arasında *E. coli*'de olduğu gibi bir fark yoktu. KÜ'nün etkisi ile LiCl ve kombinasyon grubu kıyaslandığında, KÜ'nün bakteri kolonisi azaltma oranı diğer iki grubun oranından biraz daha fazla olup değerler biraz benzer olsa da aradaki fark her iki grup için istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P_{LiCl}<0.05$; $P_{KÜ+LiCl}<0.05$).

S. aureus grubundaki değerlendirmede kontrol grubu ile yapılan kıyaslamada kombinasyon grubu en yüksek antibakteriyel etkiyi göstermiş ($p<0.0000$), sonra bunu tek başına LiCl grubu izlemiş ($p<0.0000$) ve en düşük antibakteriyel etkiyi de KÜ grubu ($p<0.0000$) gösterdi. Ancak diğer iki bakteri grubunda olduğu gibi LiCl ile kombinasyon grubunun koloni azaltma oranı birbirine çok yakın olduğundan dolayı birbiri ile yapılan kıyaslamada ikisinin yaptığı koloni azaltma oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Tek başına LiCl kullanılması ile kombinasyon grubu uygulaması yapılması arasında bir fark yoktu. KÜ'nün etkisi ile LiCl ve kombinasyon grubu kıyaslandığında, KÜ'nün bakteri kolonisi azaltma oranı diğer iki grubun oranından biraz daha az ve azaltma oranları biraz yakın olsa da aradaki fark her iki grup için istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P_{LiCl}<0.05$; $P_{KÜ+LiCl}<0.05$).

Bakteriler arasında bir kıyaslama yapıldığında KÜ'nün en yüksek antibakteriyel etkiyi *S. typhi*'de ($p<0.05$), orta derecede *E. coli*'de ($p<0.05$), en düşük etkiyi de *S. aureus*'da ($p<0.05$) yaptığı saptandı. LiCl'ün en yüksek antibakteriyel etkiyi *E. coli*'de ($p<0.05$), orta derecede *S. typhi*'de ($p<0.05$), en düşük etkiyi de *S. aureus*'da ($p<0.05$) yaptığı belirlendi. Kombinasyon grubunun ise en yüksek antibakteriyel etkiyi *E. coli*'de ($p<0.05$), orta derecede *S. typhi*'de

($p < 0.05$), en düşük etkiyi de *S. aureus*'da ($p < 0.05$) yaptığı görüldü.

Mikrodilüsyon testi bulguları

Aşağıdaki çizelgede (Çizelge 3) bakterilerin duyarlı olduğu antibiyotiklerin MİK90 değerleri gösterildi:

Çizelge 3. Antibiyotiklerin MİK90 değerleri

	Bakteri türü/Gruplar	Amoksisilin ($\mu\text{g/ml}$)	Amfisilin ($\mu\text{g/ml}$)	Vankomisin ($\mu\text{g/ml}$)
1	<i>E.coli</i>		≥ 8	
2	<i>S. typhi</i>	≥ 10		
3	<i>S. aureus</i>			≥ 1.5

Yukarıdaki tabloya göre *E. coli*'nin duyarlı olduğu antibiyotik amfisilindir ve MİK90 değeri $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ 'dir, *S. typhi*'nin ise duyarlı olduğu antibiyotik amoksisilindir ve MİK90 değeri $\geq 10 \mu\text{g/ml}$ 'dir, son olarak *S. aureus*'un duyarlı olduğu antibiyotik vankomisindir ve MİK90 değeri $\geq 1.5 \mu\text{g/ml}$ 'dir

Tartışma

Çalışmamızda kırmızı kurt üzümü meyvesinin özütü ve lityum klorürün birlikte kullanımının antibakteriyel etkileri *E.coli*, *S.typhi* ve *S.aureus* bakterileri üzerinde araştırıldı. Çalışma başladıktan ve bittikten sonra yapılan literatür araştırmasında kurt üzümü ve lityum klorürün birlikte kullanımına dair hiçbir çalışmaya rastlanmadı.

Ilić ve arkadaşlarının (2020) Gram-pozitif bakterilerden *S. aureus* ve Gram-negatif bakterilerden *E.coli* ile yaptığı çalışmada KÜ'nün inhibisyon etkileri gösterildi. Yapılan çalışmalarda kırmızı KÜ'nün diğer kurt üzümü türleri (Siyah, sarı) ile kıyaslandığında en düşük antibakteriyel etkiye sahip olduğu gösterildi (Liu, 2020), ancak mevcut çalışmamızda tatlı tadı, yüksek lifli olması, yüksek besleyici içeriği nedeniyle tüketici tarafından tercih edilmesi ve Türkiye'de yetiştirilebilmesi nedeniyle türler arasında en zayıf antibakteriyel etkiye sahip olan kırmızı kurt üzümü kullanıldı. Bu çalışmalarda saptandığı gibi çalışmamızda kullandığımız kırmızı kurt üzümü meyvesi, *S. aureus* ve *E.coli* ile *S. typhi*'de inhibisyon etkisi gösterdi.

Mocan ve arkadaşları (2015), KÜ'nün çiçeklerinin en iyi antibakteriyel etkiyi *S. aureus*'da, orta derecede antibakteriyel etkiyi de *S. typhi* bakterisine karşı gösterdiğini belirledi. Bu çalışmanın aksine çalışmamızda KÜ meyvesinin en zayıf etkiyi Mocan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan farklı olarak *S. aureus*'a karşı gösterdiği saptandı. Ayrıca bu araştırmacıların çalışmasında, KÜ çiçeklerinin *Escherichia coli* üzerine etkisi olmadığı da saptanmıştı (Mocan ve ark., 2015), ancak mevcut çalışmamızda onların bulgularından farklı olarak KÜ'nün *E.coli* bakterisine karşı da yüksek inhibisyon etkisine sahip olduğunu da gösterildi.

Mocan ve ark. (2014)'nın yaptığı diğer bir çalışmada, *L. chinense* özütlerinin Gram-negatif bakterilerde ve Gram-pozitif bakterilerde *L. barbarum*'a göre daha yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduğu gösterildi. Bu yaptığımız çalışmada, KÜ'nün *L. barbarum* türünün meyvesinden elde edilen özütün kapsülüzasyon şekli kullanıldı. Çalışmamızda *L. barbarum* türünün kullanılmasının nedeni *L. barbarum*'un *L. chinense*'ye göre daha tatlı olması ve bundan dolayı tüketici tarafından daha fazla tercih edilmesiydi (Liu, 2020).

Çalışmamızda kurt üzümü meyvelerinin tercih edilmesinin nedeni tüketicilerin kurt üzümü yaprak, çiçeklerinden daha fazla kurt üzümü meyvelerini, günlük hayatlarında besin ögesi olarak kabul edip onları işleyip ve/veya pişirip kullanmalarıydı (Ma ve ark., 2019). Kurt üzümü çiçek ve yapraklarından

çok daha az antibakteriyel kapasiteye sahip olsa da kurt üzümü meyvelerinin de sahip olduğu antibakteriyel kapasite neticesinde bu tercih yapıldı (Ilić ve ark., 2020).

Mevcut çalışmamızda lityum klorürün kullanılmasının nedeni ise gıda kontaminantları arasında yer alması, bakteri duyarlılığını değiştirebilme yeteneği olması ve buna bağlı dezenfektan içeriklerinde de yer alması, bunun yanısıra bilhassa kinikte psikiyatrik tedavilerde yoğun olarak tercih edilmesi ve aynı zamanda da beyin tümörleri dahil olmak üzere çeşitli kanser dahil birçok hastalıkta terapötik ajan olarak yine klinikte kullanılmasıdır.

Gu ve arkadaşları (2022), LiCl'ü 10%, 20%, 30%, 40% konsantrasyonlarda bakterilere uyguladı ve deneylerinde LiCl uygulamasının *S. aureus* üzerine zayıf antibakteriyel etki gösterdiğini ve bakterinin dirençli olduğunu saptadı. Cebrián ve arkadaşları (2014) *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterococcus faecium*, *E. coli* and *S. typhi* bakterilerinde sodyum klorür, LiCl ve sodyum asetat denemeleri yapmış, LiCl ile ilgili sonuçlara bakıldığında en dirençli bakterinin *S. aureus* (MİK:0.685M=685mM), en duyarlı bakterilerin ise *E. coli* (MİK:0.173M=173mM) ve *S. typhi* (MİK:0.196M=196mM) olduğunu saptamıştır. Yukarıda referans olarak bahsedilen çalışmalarla uyumlu olarak yaptığımız mevcut çalışmada da *S. aureus* LiCl'e karşı en dirençli bakteri, *E. coli* ise en duyarlı bakteri olarak belirlendi. Çalışmamızda, yukarıda bahsedilen çalışmalarla uyumlu olarak koloni inhibisyon sayıları üzerinden değerlendirme yapıldığında LiCl'ün en yüksek antibakteriyel etkiyi *E. coli*'de, *E. coli*'ye az bir farkla orta derecede *S. typhi*'de, en düşük antibakteriyel etkiyi de *S. aureus*'da gösterdiği belirlendi. Buna ek olarak yaptığımız çalışmada MİK değerlerine bakıldığında LiCl'ün *S. aureus*'daki MİK90 değerinin (≥ 500 mM) diğer bakterilere oranla çok daha yüksek olduğu görüldü. Cebrian ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmadaki uygulama dozları, mevcut çalışma ile kıyaslandığında her iki çalışmada mM cinsinden LiCl uygulandığı, mevcut uygulamamızdaki LiCl dozlarının da Cebrian ve arkadaşlarının uygulamasına göre daha düşük olduğu görüldü.

Inaba ve arkadaşları (1994) lityum iyonunun, ortamda yüksek konsantrasyonda bulunduğu *E. coli* bakterilerine karşı toksisite gösterdiğini saptadı. Li^+ , bir $Na^+(Li^+)/H^+$ antiporter (NhaA sistemi ve NhaB sistemi) yoluyla hücrelerden atıldığı için Li^+ 'nin detoksifikasyonunda yer almaktadır. Inaba ve arkadaşları (1994), *E. coli*'de iki $Na^+(Li^+)/H^+$ antiporterlerden birinin veya her ikisinin de eksik olduğu mutantları kullanarak Li^+ 'nin detoksifikasyonuna katılımını araştırdı. İki sistemin Li^+ afinitesi hemen hemen aynı olmasına rağmen, mu-

tant tipte NhaA sistemi olmadığı zaman 0.6M LiCl varlığında bakterinin büyümediğini, ancak NhaB sisteminden yoksun bir mutantın 0.6M LiCl varlığında büyüdüğünü çalışmalarında saptandı. Buna ek olarak, hem NhaA hem de NhaB sistemlerinden yoksun bir mutantın çok düşük LiCl konsantrasyonlarında (30 mM) büyümediğini de çalışmalarında belirlendi (Inaba et al., 1994). Mevcut çalışmamızda da, LiCl'ün E. coli üzerinde inhibisyon etkisi saptandı, ancak Inaba ve arkadaşlarının (1994) yaptığı çalışma ile kıyaslandığında yaptığımız çalışmada kullanılan LiCl konsantrasyonlarının yüksek olduğu görüldü.

LiCl ile yapılan başka bir çalışmada LiCl'ün GSK-3 α inhibisyonu üzerinden yine konak savunma sistemi aktivasyonu ile tavuk bağırsağında Salmonella enterica serovar Enteritidis bakteri kolonizasyonunu azalttığını saptanmıştı (Kogut ve ark., 2014). Yaptığımız çalışma, başka bir serovar ile yapılmış in vitro bir çalışmadır ve mevcut çalışmamızda S.typhi'nin direkt inhibisyon etkisi gözlemlendi.

Kurt üzümü çiçek ve yaprakları ile yapılan önceki çalışmalarda kurt üzümü özütleri $\mu\text{g/ml}$ cinsinden çok düşük konsantrasyonlarda antibakteriyel etki gösterirken, meyveleri ile yapılan çalışmalarda mg/ml cinsinden antibakteriyel etki gösterdiği görüldü (Ilić et al., 2020; Mocan et al., 2014; Mocan et al., 2015). KÜ meyvelerinin özütleri ile yapılan mevcut çalışmamızda KÜ inhibisyon değerleri mg/ml cinsinden belirlendi. Lityum klorürün uygulaması molarite birimi üzerinden gerçekleştirildi. Bakterilerin duyarlı olduğu antibiyotiklerle yapılan mevcut çalışmadaki uygulamalar daha önceki çalışmalarda olduğu gibi $\mu\text{g/ml}$ biriminden uygulandı ve mevcut çalışmada bu çalışmalarla benzer inhibisyon konsantrasyonları saptandı. (Balouri ve ark., 2016). Antibiyotiklerin inhibisyon konsantrasyonları ile KÜ'nün ve lityum klorürün inhibisyon konsantrasyonları kıyaslandığında, tekli uygulanan ve kombine edilen kurt üzümü ve lityum klorür konsantrasyonlarının antibiyotiklere göre çok yüksek olduğu saptandı.

Mevcut çalışmada, kombinasyon grubunun antibakteriyel etkilerinin tek başına uygulanan LiCl ile çok benzer olduğu görüldü. Tek başına uygulanan LiCl ile kombinasyon grubunun koloni sayılarını azaltma oranları birbirlerine çok yakın olup istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı. Kurt üzümü grubu ile de inhibisyon oranları birbirine yakın olsa da koloni sayılarındaki azalma oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. S. typhi hariç kurt üzümünün koloni sayısını azaltma oranları, LiCl ve kombinasyon gruplarının

koloni sayısını azaltma oranlarından çok daha düşük olsa da yalnız *S.typhi*'de KÜ diğer gruplara göre koloni sayısını istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde en yüksek derecede azalttı. Buna göre ikisinin birarada kullanılması bir fayda sağlamazken, lityum klorürün bu kombinasyonda daha baskın olduğu ve kurt üzümünün etkisini baskıladığı görüldü. Kombinasyonda her iki test maddenin MİK90 değerleri kullanıldı. Kurt üzümü ile LiCl'ün MİK50 gibi diğer MİK değerlerine bakılmadı. Buna göre KÜ ve LiCl'ün MİK90 değerleri ile birarada antibakteriyel etkilerini izleme açısından kullanılması destekleyici tedavi etkinliği bakımından değerlendirildiğinde, tedavi etkinliğinin azalması ile sonuçlanabileceği ve hepatoksisite gibi yan etkiler bakımından da sakıncalı olabileceği kanaatine varıldı. Vaka tipine göre tek başına kurt üzümünün kullanılmasının ya da tek başına LiCl'ün kullanılmasının daha uygun olabileceği görüşünde birleşildi.

Bu çalışmada lityum klorür ve kurt üzümünün birlikte kullanımının birbirlerini nasıl etkileyebileceği kısıtlı sayıda ve türde bakteri kullanılarak in vitro olarak çalışıldı. Bu çalışmada kullanılan bakteriler, toplumda çok yaygın görülen gıda kaynaklı hastalıklara neden olduğu için seçildi. Ancak ikisinin birlikte uygulamasının daha fazla sayıda ve türde Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerde test edilmesi gerektiği kanaatindeyiz. Ayrıca bu kombinasyonun, in vivo çalışmada heterojen bağırsak mikrobiyota popülasyonu üzerinde antibakteriyel etkilerinin araştırılması gerektiği ve buna ek olarak da KÜ ve LiCl'ün terapotik serum konsantrasyonları, immün cevapları ve toksik etkileri açısından da değerlendirilmesi gerektiği görüşünde birleşildi.

Sonuç olarak, bu çalışmada tek başına uygulanan lityum klorür veya kurt üzümünün uygulama yapılan tüm bakteri türlerinin çoğalmasının inhibisyonu için yeterli olduğu, ikisinin bir arada kullanımının birbirlerinin antibakteriyel etkilerini artırmadığı, aksine LiCl'ün bu konuda baskın olduğu ve kurt üzümünün ekstra bir etki gösteremediği saptandı.

Kaynaklar

[1]Amagase, H., Farnsworth, N. R. (2011). A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). *Food Research International*, 44, 1702–1717.

[2]Amro, M. , Teoh, L., Norzana, A. G. ve ark., (2018). The potential role of herbal products in the treatment of Parkinson's disease. *La Clinica Terapeutica*, 169 (1), e23–e33.

- [3]Aras, Y., Erguven, M., Aktas, E. ve ark., (2016). Antagonist activity of the antipsychotic drug lithium chloride and the antileukemic drug imatinib mesylate during glioblastoma treatment in vitro. *Neurological Research*, 38 (9), 766–774.
- [4]Balouiri, M., Sadiki, M., Koraichi Ibsouda, S. (2016). Methods for in vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71- 79.
- [5]Benchennouf, A., Grigorakis, S., Loupassaki, S. ve ark., (2017). Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Lycium barbarum* (Goji) cultivated in Greece. *Pharmaceutical Biology*, 55, 596–602
- [6]Bunyavanich, S., Shen, N., Grishin, A. ve ark., (2016). Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138 (4), 1122–1130.
- [7]Cebrián, G., Arroyo, C., Mañas, P. ve ark., (2014). Bacterial maximum non-inhibitory and minimum inhibitory concentrations of different water activity depressing solute. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 67–74.
- [8]Chen, K., Wu, Y., Zhu, M. ve ark., (2013). Lithium chloride promotes host resistance against *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Molecular Vision*, 19, 1502–1514.
- [9]Chu, D., MA, J., Prince, A. ve ark., (2017) Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nature Medicine*, 23 (3), 314–326.
- [10]Donno, D., Beccaro, G.L., Mellano, M.G. ve ark., (2015). Goji berry fruit (*Lycium* spp.): Antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. *Journal of Functional Foods*, 18, 1070–1085.
- [11]Erguven, M., Oktem, G., Kara, A. N. ve ark. (2016). Lithium chloride has a biphasic effect on prostate cancer stem cells and a proportional effect on midkine level. *Oncology Letters*, 12 (4), 2948–2955.
- [12]Gallo, M., Ferrara, L., Calogero, A., Montesano, D., Naviglio, D. (2020). Relationships between food and diseases: What to know to ensure food safety. *Food Research International*, 137, 109414.
- [13]Gebrayel, P., Nicco, C., Al Khodor, S., Bilinski, J., Caselli, E., Comelli, E. M., Egert, M., Giaroni, C., Karpinski, T. M., Loniewski, I., Mulak, A., Reygner, J., Samczuk, P., Serino, M., Sikora, M., Terranegra, A., Ufnal, M., Villegier, R., Pichon, C., Konturek, P., Edeas, M ve ark. (2022). Microbiota medicine: towards clinical revolution. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 111.

- [14]Gomaa, E.Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113, 2019–2040.
- [15]Gu, Y., Zhong, K., Cao, R., & Yang, Z. (2022). Aqueous lithium chloride solution as a non-toxic bactericidal and fungicidal disinfectant for air-conditioning systems: Efficacy and mechanism. *Environmental Research*, 212(Pt A), 113112.
- [16]Hasan, N., Yang, H. (2019). Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *Peer J*, 7:e7502.
- [17]Hung, H. C., Shih, R., Chang, T. Y. ve ark., (2014). The combination effects of licl and the active leflunomide metabolite, A771726, on viral-induced interleukin 6 production and EV-A71 replication. *PloS One*, 9 (11), e111331.
- [18]Ilić, T., Dodevska, M., Marčetić, M. ve ark., (2020). Chemical Characterization, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Goji Berries Cultivated in Serbia. *Foods*, 9 (11), 1614.
- [19]Inaba, K., Kuroda, T., Shimamoto, T. ve ark., (1994). Lithium toxicity and Na⁺(Li⁺)/H⁺ antiporter in Escherichia coli. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 17 (3), 395–398.
- [20]Jethwani, P., Grover, K. (2019) Gut microbiota in health and diseases—a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8 (8), 1586–1599.
- [21]Jiang, H., Zhang, W., Li, X. ve ark., (2021) The anti-obesogenic effects of dietary berry fruits: A review. *Food Research International*, 147, 110539.
- [22]Jiang, Y., Fang, Z., Leonard, W. ve ark., (2021). Phenolic compounds in Lycium berry: Composition, health benefits and industrial application. *Journal of Functional Foods*, 77, 104340.
- [23]Jie, Z., Xia, H., Zhong, S. L. ve ark., (2017). The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature Communications*, 8(1), 845.
- [24]Karlsson, F., Tremaroli, V., Nielsen, J. ve ark., (2013). Assessing the human gut microbiota in metabolic disease. *Diabetes*, 62 (10), 3341–3349.
- [25]Kelly, C., Zheng, L., Campbell, E. ve ark., (2015) Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell Host Microbe*, 17 (5), 662–671.
- [26] Kelly, D., King, T., Aminov, R. (2007). Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutation Research*, 622 (1-2), 58–69.

- [27]Kelly, J.R., Kennedy, P.J., Cryan, J.F. ve ark.,(2015) Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 392–411
- [28]Kogut, M. H., Swaggerty, C. L., Chiang, H. I. ve ark., (2014). Critical Role of Glycogen Synthase Kinase-3 β in Regulating the Avian Heterophil Response to Salmonella enterica Serovar Enteritidis. *Frontiers in Veterinary Science*, 1, 10.
- [29]Lei, Z., Yang, L., Lei, Y. ve ark., (2021). High dose lithium chloride causes colitis through activating F4/80 positive macrophages and inhibiting expression of Pigr and Claudin-15 in the colon of mice. *Toxicology*, 457, 152799.
- [30]Licht, R. W. (2012). Lithium: still a major option in the management of bipolar disorder. *CNS neuroscience & therapeutics*, 18 (3), 219–226.
- [31]Liechti, F. D., Stüdle, N., Theurillat, R. ve ark., (2014). The mood-stabilizer lithium prevents hippocampal apoptosis and improves spatial memory in experimental meningiti. *PLoS One*, 9 (11), e113607.
- [32]Liu, B., Xu, Q., Sun, Y. (2020). Black goji berry (*Lycium ruthenicum*) tea has higher phytochemical contents and in vitro antioxidant properties than red goji berry (*Lycium barbarum*) tea. *Food Quality and Safety*, 4, 193–201.
- [33]Ma, Z. F., Zhang, H., Teh, S. S. ve ark., (2019). Goji Berries as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Their Molecular Mechanisms of Action. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2437397.
- [34]Makola, R. T., Kgaladi, J., More, G. K. ve ark., (2021). Lithium inhibits NF- κ B nuclear translocation and modulate inflammation profiles in Rift valley fever virus-infected Raw 264.7 macrophage. *Virology Journal*, 18 (1), 116.
- [35]Mills, S., Stanton, C., Lane, J. A. ve ark., (2019). Precision Nutrition and the Microbiome, Part I: Current State of the Science. *Nutrients*, 11(4), 923.
- [36]Mocan, A., Moldovan, C., Zengin, G. ve ark., (2018). UHPLC-QTOF-MS analysis of bioactive constituents from two Romanian Goji (*Lycium barbarum* L.) berries cultivars and their antioxidant, enzyme inhibitory, and real-time cytotoxicological evaluation. *Food and Chemical Toxicology*, 115, 414–424.
- [37]Mocan, A., Vlase, L., Vodnar, D.C. ve ark., (2015). Antioxidant, Antimicrobial Effects and Phenolic Profile of *Lycium barbarum* L. Flower. *Molecules*, 20 (8), 15060-15071.
- [38]Mocan, A., Vlase, L., Vodnar, D.C. ve ark., (2014). Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. Leave. *Molecules*, 19 (7), 10056–10073.

- [39]Murru, A., Manchia, M., Hajek, T. ve ark., (2020). Lithium's antiviral effects: a potential drug for CoViD-19 disease? *International Journal of Bipolar Disorders*, 8 (1), 21.
- [40]Nagpal, R., Tsuji, H., Takahashi, T. ve ark., (2017). Ontogenesis of the gut microbiota composition in healthy, full-term, vaginally born and breast-fed infants over the first 3 years of life: a quantitative bird's-eye view. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1388–1400.
- [41]Najafi, S., Heidarali, Z., Rajabi, M. ve ark., (2021). Lithium and preventing chemotherapy-induced peripheral neuropathy in breast cancer patients: a placebo-controlled randomized clinical trial. *Trials*, 22 (1), 835.
- [42]Niro, S., Fratianni, A., Panfili, G. ve ark., (2017). Nutritional evaluation of fresh and dried goji berries cultivated in Italy. *Italian Journal of Food Science*, 29, 398–408.
- [43]Nishino, K., Nishida, A., Inoue, R. ve ark., (2018). Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology*, 53 (1), 95–106.
- [44]Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H. ve ark., (2016). Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross sectional study. *BMC Microbiology*, 16 (1), 90–112.
- [45]Passos, M.C.F., Moraes-Filho, J.P. (2017). Intestinal microbiota in digestive disease. *Arquivos de Gastroenterologia*, 54 (3), 255–262.
- [46]Pedro, A.C., Sánchez-Mata, M.C., Pérez-Rodríguez, M.L. ve ark., (2019). Qualitative and nutritional comparison of goji berry fruits produced in organic and conventional system. *Scientia Horticulturae*, 257, 108660.
- [47]Qian, K., Cheng, X., Zhang, D. ve ark., (2018). Antiviral effect of lithium chloride on replication of avian leukosis virus subgroup. J in cell culture. *Archives of Virology*, 163 (4), 987–995.
- [48]Quigley, E. (2013). Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterology&Hepatology*, 9 (9), 560–569.
- [49]Robles-Alonso, V., Guarner, F., (2013). Progress in the knowledge of the intestinal human microbiota. *Nutricion Hospitalaria*, 28 (3), 553–557.
- [50]Rothschild, D., Weissbrod, O., Barkan, E. ve ark., (2018). Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature*, 555 (7695), 210–215.
- [51]Ruffo, M., Parisi, O.I., Amone, F. ve ark., (2017). Calabrian Goji v Chinese Goji: A comparative study on biological properties. *Foods*, 6 (4),30.

- [52]Rybakowski, J. K., (2022). Antiviral, immunomodulatory, and neuroprotective effect of lithium. *Journal of Integrative Neuroscience*, 21 (2), 68.
- [53]Schrauzer, G. N., (2002). Lithium: occurrence, dietary intakes, nutritional essentiality. *Journal of the American College of Nutrition*, 21 (1), 14–21.
- [54]Shokeen, K., Srivathsan, A., Kumar, K., (2021). Lithium chloride functions as Newcastle disease virus-induced ER-stress modulator and confers anti-viral effect. *Virus Research*, 292, 198223.
- [55]Stachelska M. A. (2015). Inhibitory properties of lithium, sodium and potassium o-, m- and p-coumarates against *Escherichia coli* O157:H7. *Acta scientiarum polonorum. Technologia Alimentaria*, 14 (1), 77–84.
- [56]Suganthi, M., Sangeetha, G., Gayathri, G. ve ark., (2012). Biphasic dose-dependent effect of lithium chloride on survival of human hormone-dependent breast cancer cells (MCF-7). *Biological Trace Element Research*, 150 (1-3), 477–486.
- [57]Tsao, N., Kuo, C. F., Chiu, C. C. ve ark., (2015). Protection against *Klebsiella pneumoniae* using lithium chloride in an intragastric infection model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59 (3), 1525–1533.
- [58]Tsao, N., Kuo, C.F., Cheng, M.H. ve ark., (2019) Streptolysin S induces mitochondrial damage and macrophage death through inhibiting degradation of glycogen synthase kinase-3 β in *Streptococcus pyogenes* infection. *Scientific Reports*, 9 (1), 5371.
- [59]Welshons, W. V., Engler, K. , Taylor, J. A. ve ark., (1995). Lithium-stimulated proliferation and alteration of phosphoinositide metabolites in MCF-7 human breast cancer cell. *Journal of Cellular Physiology*, 165 (1), 134–144.
- [60]Wen, J., Sawmiller, D., Wheeldon, B., Tan, J. (2019). A Review for Lithium: Pharmacokinetics, Drug Design, and Toxicity. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 18 (10), 769–778.
- [61]Wiley, N., Dinan, T, Ross, R. ve ark., (2017). The microbiota-gut-brain axis as a key regulator of neural function and the stress response: implications for human and animal health. *The Journal of Animal Science*, 95 (7), 3225–3246.
- [62]Won, E., Kim, Y. K. (2017). An Oldie but Goodie: Lithium in the Treatment of Bipolar Disorder through Neuroprotective and Neurotrophic Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (12), 2679.
- [63]Wong, K., Chin, K. Y., Ima-Nirwana, S., (2020). The Skeletal-Protecting Action and Mechanisms of Action for Mood-Stabilizing Drug Lithium Chloride: Current Evidence and Future Potential Research Area. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 430.

[64]Yun, D., Yan, Y., & Liu, J. (2022). Isolation, structure and biological activity of polysaccharides from the fruits of *Lycium ruthenicum* Murr: A review. *Carbohydrate Polymers*, 291, 119618.

[65]Zanni, G., Di Martino, E., Omelyanenko, A. ve ark., (2015). Lithium increases proliferation of hippocampal neural stem/progenitor cells and rescues irradiation-induced cell cycle arrest in vitro. *Oncotarget*, 6 (35), 37083–37097.

[66]Zheng, P., Zeng, B., Liu, M. ve ark., (2019). The gut microbiome from patients with schizophrenia modulates the glutamate-glutamine-GABA cycle and schizophrenia-relevant behaviors in mice. *Science Advances*, 5 (2), 8317–8832.