



**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**SANGUİNARİNE ve ASKORBİK ASİT
KOMBİNASYONLARININ ICA-BAĞIMLI BİYOFİLM
ÜRETEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARI
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Havva KAŞIKÇI**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Sahra KIRMUSAOĞLU**

İstanbul 2019

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

SANGUİNARİNE ve ASKORBİK ASİT
KOMBİNASYONLARININ İCA-BAĞIMLI BİYOFİLM
ÜRETEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARI
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan
Havva KAŞIKÇI

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Sahra KIRMUSAOĞLU

İstanbul 2019

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Havva KAŞIKÇI tarafından hazırlanan "*Sanguinarine ve Askorbik Asit Kombinasyonlarının İca-Bağımlı Biyofilm Üreten Staphylococcus aureus İzolatları Üzerindeki Etkisinin Araştırılması*" konulu çalışması jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28.06.2019

(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu):

İmzası

Jüri Üyesi : Dr.Öğr.Üy.Sahra KIRMUSAOĞLU
: Haliç Üniversitesi (Danışman)



Jüri Üyesi : Prof.Dr.Emel BOZKAYA
: Haliç Üniversitesi

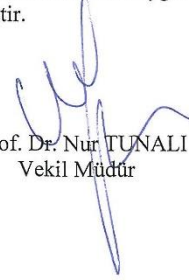


Jüri Üyesi : Dr.Öğr.Üy.Murat TELLİ
: Abant İzzet Baysal Üniv.



Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nur TUNALI
Vekil Müdür




İntihal Raporu

ORJİNALLİK RAPORU

% 10	% 4	% 2	% 9
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Univerza v Ljubljani Öğrenci Ödevi	% 2
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 2
3	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	% 1
5	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
6	Submitted to Gumushane University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	www.bdigital.unal.edu.co İnternet Kaynağı	<% 1

Doç. Dr. Selva KIRGUSKÖZ


28/06/2019

TEZ ETİK BEYANI

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Sanguinarine ve Askorbik Asit Kombinasyonlarının İca-Bağımlı Biyofilm Üreten *Staphylococcus aureus* İzolatları Üzerindeki Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Sahra KIRMUSAOĞLU’nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ve analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Havva KAŞIKÇI



ÖNSÖZ

Tez çalışması sürecinde tezin bilimsel dizaynı, metotların uyarlanması, verilerin eldesi ve analizi başta olmak üzere her türlü desteği sağlayan ilgi ve anlayışını hiç eksik etmeyen, tez danışman hocam Sn. Dr. Öğr. Üyesi Sahra KIRMUSAOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım süresince vermiş oldukları destekleri için Sn. Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ, Sn. Dr. Öğr. Üyesi Özlem SAĞLAM UÇAR, Arş. Gör. Anıl CEBECİ'ye teşekkür ederim.

Yüksek lisansa başlamama vesile olan, hayattaki duruşuyla her zaman örnek olan, maddi manevi her zaman desteğini esirgemeyen anlayışlı, sevgi dolu davranan Sn. Prof. Dr. Kadriye KART YAŞAR'a sonsuz minnettarım.

Tez çalışması süresince bilgisini, anlayışını, sevgisini paylaşan, yardım ve destekleriyle yanımda olan çok sevgili arkadaşlarım Özge BARIM, Gizem SÜMER, Oğuzhan YILMAZ, Seval TURNA, Betül CEYLANER, Hatice TİTİZ'e çok teşekkür ederim.

Bu süreçte bana destek olan, sevgili çalışma arkadaşlarım Merve İLHAN ve Fatma BAYRAK ERDEM'e çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan varlıklarını hayatımın her anında hissettiren, maddi manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili ailem; annem Hasiye KAŞIKÇI ve babam Mahmut KAŞIKÇI'ya sonsuz teşekkürler.

Haziran, 2019

Havva KAŞIKÇI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER	I
KISALTMALAR	IV
SEMBOLLER	VI
ŞEKİLLER	VII
ÇİZELGELER	IX
ÖZET.....	XI
ABSTRACT	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Epidemiyoloji	3
2.1.1. Stafilokokal Biyofilmlerinin Tıbbi ve Epidemiyolojik Önemi.....	3
2.2. Stafilokok Biyofilmlerinin Patogenezi	4
2.3. Stafilokok Biyofilmleri ve Virülans Faktörleri	6
2.4. Biyofilm Oluşum Mekanizmaları.....	7
2.4.1. Aderans/Adezyon (Yapışma) Aşaması.....	7
2.4.2. Olgunlaşma Aşaması	8
2.4.3. Dağılma Aşaması.....	8
2.5. Biyofilm Oluşum Tipleri	9
2.5.1. PIA Bağımlı Biyofilm Oluşumu	9
2.5.2. PIA Bağımsız Biyofilm Oluşumu.....	10
2.6. Biyofilm İçerisinde Bulunan Mikroorganizmalarda Antibiyotik Direnç Mekanizmaları.....	11

2.6.1. Sanguinarine (SAN).....	11
2.6.2. L-Askorbik Asit	12
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	13
3.1. Biyolojik Örneklerin Hazırlanması ve Mikrobiyolojik Analizleri	13
3.2. Stafilocok İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	13
3.2.1. Stafilocoklarda Metisilin Direncinin Saptanması.....	13
3.2.2. Stafilocoklarda β -Laktamaz Varlığının Tespit Edilmesi	14
3.3. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarında Gen Varlığının Tespiti.....	14
3.3.1. Primer Tasarımı	14
3.3.2. Genomik DNA İzolasyonu	15
3.3.3. Kalitatif GZ-PZR Reaksiyonu	16
3.4. Biyofilm İdentifikasyonu	17
3.4.1. Tüp Metodu (TM).....	17
3.4.2. Mikrotitre Plak (MtP) Metodu.....	17
3.5. Bakteri Süspansiyonlarının ve Kimyasalların Hazırlanması.....	19
3.5.1. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması.....	19
3.5.2. L-Askorbik Asit Hazırlanması.....	19
3.5.3. Sanguinarine Klorür Hidrat (SAN) Hazırlanması	19
3.6. Sanguinarine ve Askorbik Asit MİK ve MBK'lerinin Belirlenmesi.....	20
3.7. Sanguinarine ve Askorbik Asit Kombinasyonlarının Planktonik <i>S. aureus</i> İzolatları Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	20
3.7.1. Checkerboard Metot (Dama Tahtası Yöntemi)	20
3.8. Sanguinarine ve Askorbik Asitin <i>S. aureus</i> İzolatlarının Biyofilm Üretimi Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	22
3.8.1. Mikrotitre Plak Metodu (MtP).....	22
3.9. Sanguinarine ve Askorbik Asitin Olgun Biyofilm Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	23
3.9.1. MBEK Metodu	23
3.10.Sanguinarine ve Askorbik Asitin Biyofilm Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi	25
3.10.1. Bakteriyel İzolatlar ve Büyüme Koşulları	25
3.10.2. Total RNA Bakteri İzolasyonu	25
3.10.3. cDNA Sentezi	27
3.10.4. Kantitatif GZ-PZR Reaksiyonu	27
3.11. Verilerin Analizi.....	28

4. BULGULAR	30
4.1. Bakterilerin Tanımlanması	30
4.2. <i>S. aureus</i> Bakterilerinde Kalitatif Gen Tespiti	30
4.3. Biyofilm İdentifikasyonu	31
4.3.1. Tüp Metot Sonucu	31
4.3.2. Mikrotitre Plak Metodu (MtP) Sonucu	31
4.4. Sanguinarine ve Askorbik Asitin MİK ve MBK Sonuç Değerlendirilmesi	32
4.5. Sanguinarine ile Askorbik Asit Kombinasyonlarının Planktonik <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatları Üzerindeki Etkisi	32
4.5.1. MSSA1	32
4.5.2. MSSA2	37
4.5.3. MSSA3	41
4.5.4. MSSA4	45
4.6. <i>S. aureus</i> İzolatları Üzerindeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin Biyofilm Üretimi Üzerindeki Etkisi	49
4.7. Sanguinarine ve Askorbik Asitin Olgun Biyofilm Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi (MBEK)	59
4.8. Sanguinarine ve Askorbik Asitin Biyofilm İlişkili Genlerin Ekspresyonları Üzerindeki Etkisi	65
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇLAR	77
7. KAYNAKLAR	78
8. ÖZGEÇMİŞ	84

KISALTMALAR

AA	: Askorbik Asit
Agr	: Aksesuar gen regülatörü
ATL	: Otolizin
Bap	: Biyofilm İlişkili Protein
BMİK	: Biyofilm minimum inhibitör konsantrasyon
C.Vit	: C Vitamini
CWA	: Hücre Duvarına Bağlı Proteinler
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ECM	: Ekstraselüler Matriks
eDNA	: Ekstraselüler DNA
EPS	: Ekzopolisakkaritler
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EPS	: Ekstraselüler Polisakkaritler
FnbA	: Fibronektin-Bağlanma Proteini A
FnbB	: Fibronektin-Bağlanma Proteini B
FtsZ	: Filament Sıcaklığına Duyarlı Mutant Z
GZ-PZR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Ica	: Interselüler Adezin
KNS	: Koagülaz Negatif Stafilokok
MBK	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MBEK	: Minimal Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyon
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
MRSA	: Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	: Metisilin Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
MtP	: Mikrotitre Plak
OD	: Optik Dansite
PBS	: Fosfat Tamponu
PIA	: Polisakkarit Intraselüler Adezin

PNAG : Poli- β -1,6- N-Asetil Glukozamin
SAN : Sanguinarine
SD : Standart Sapma (Standard deviation)
UV : Ultraviyole
PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu



SEMBOLLER

°C	: Santigrat Derece
Cfu	: Colony Forming Unit
Dk	: Dakika
G	: Gravite
gr	: Gram
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum Klorür
ng	: Nanogram
µg	: Mikrogram
nm	: Nanometre
OD	: Optical Density
P	: Anlamlılık
Sn	: Saniye
µM	: Mikromolar
µL	: Mikrolitre
β	: Beta
Σ	: Epsilon

ŞEKİLLER

Sayfa No.

Şekil 2.1. Biyofilmlerle ilişkili temel enfeksiyonlar	5
Şekil 2.2. Stafilokokal biyofilm oluşumu ve ilgili faktörler	6
Şekil 2.3. Ekzopolisakkarit PIA/PNAG oluşum mekanizması.....	10
Şekil 2.4. Sanguinarine kimyasal yapısı	11
Şekil 4.1. Tüp metodu şekli.	31
Şekil 4.2. MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA1 suşunun (ATCC 29213) büyüme oranına etkisi.....	34
Şekil 4.3. 1/2 MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA1 suşunun (ATCC 29213) büyüme oranına etkisi.....	34
Şekil 4.4. 1/4 MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA1 suşunun (ATCC 29213) büyüme oranına etkisi.....	35
Şekil 4.5. 1/8 MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA1 suşunun (ATCC 29213) büyüme oranına etkisi.....	36
Şekil 4.6. 1/16 MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA1 suşunun (ATCC 29213) büyüme oranına etkisi.....	36
Şekil 4.7. MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA2 izolatının büyüme oranına etkisi.	38
Şekil 4.8. 1/2 MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA2 izolatının büyüme oranına etkisi.	39
Şekil 4.9. 1/4 MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA2 izolatının büyüme oranına etkisi.	39
Şekil 4.10. 1/8 MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA2 izolatının büyüme oranına etkisi.	40
Şekil 4.11. 1/16 MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA2 izolatının büyüme oranına etkisi.	40
Şekil 4.12. MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA3 izolatının büyüme oranına etkisi.	42
Şekil 4.13. 1/2 MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA3 izolatının büyüme oranına etkisi.	43
Şekil 4.14. 1/4 MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA3 izolatının büyüme oranına etkisi.	43
Şekil 4.15. 1/8 MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA3 izolatının büyüme oranına etkisi.	44
Şekil 4.16. 1/16 MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA3 izolatının büyüme oranına etkisi.	44
Şekil 4.17. MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA4 izolatının büyüme oranına etkisi.	46

Şekil 4.18. 1/2 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA4 izolatının büyüme oranına etkisi.....	47
Şekil 4.19. 1/4 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA4 izolatının büyüme oranına etkisi.	47
Şekil 4.20. 1/8 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA4 izolatının büyüme oranına etkisi.	48
Şekil 4.21. 1/16 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA4 izolatının büyüme oranına etkisi.	48
Şekil 4.22. Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA1 suşunun biyofilm üretimi üzerindeki etkisi.....	50
Şekil 4.23. Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA2 izolatının biyofilm üretimi üzerindeki etkisi.....	53
Şekil 4.24. Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA3 izolatının biyofilm üretimi üzerindeki etkisi.....	55
Şekil 4.25. Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA4 izolatının biyofilm üretimi üzerindeki etkisi.....	58
Şekil 4.26. MSSA1 suşunda <i>IcaA</i> geni ekspresyon analizi.	66
Şekil 4.27. MSSA1 suşunda <i>IcaD</i> geni ekspresyon analizi.....	66
Şekil 4.28. MSSA1 suşunda <i>Atl</i> geni ekspresyon analizi.	67
Şekil 4.29. MSSA2 izolatında <i>IcaA</i> geni ekspresyon analizi.	67
Şekil 4.30. MSSA2 izolatında <i>IcaD</i> geni ekspresyon analizi.	68
Şekil 4.31. MSSA2 izolatında <i>Atl</i> geni ekspresyon analizi..	68
Şekil 4.32. MSSA3 izolatında <i>Atl</i> geni ekspresyon analizi.	69
Şekil 4.33. MSSA3 izolatında <i>IcaA</i> geni ekspresyon analizi	69
Şekil 4.34. MSSA3 izolatında <i>IcaD</i> geni ekspresyon analizi.	70
Şekil 4.35. MSSA4 izolatında <i>Atl</i> geni ekspresyon analizi.	70
Şekil 4.36. MSSA4 izolatında <i>IcaA</i> geni ekspresyon analizi.	71
Şekil 4.37. MSSA4 izolatında <i>IcaD</i> geni ekspresyon analizi.	71

ÇİZELGELER

Sayfa No.

Çizelge 3.1. Kalitatif GZ-PZR çalışmasında kullanılan primer dizileri	15
Çizelge 3.2. GZ-PZR reaktifleri.....	16
Çizelge 3.3. GZ-PZR koşulları	16
Çizelge 3.4. Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MİK ve MBK'lerinin belirlenmesi için kullanılan konsantrasyonlar.	22
Çizelge 3.5. Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının, biyofilm üretimi ve olgun biyofilm üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyonlar.	24
Çizelge 3.6. GZ-PZR reaktifleri.....	28
Çizelge 3.7. GZ-PZR koşulları	28
Çizelge 4.1. Gerçek zamanlı PZR çalışması yapılan ve kalitatif olarak tespit edilen genler ve sonuçları.	30
Çizelge 4.2. Planktonik <i>S. aureus</i> izolatlarında belirlenen MİK ve MBK değerleri.	32
Çizelge 4.3. Sanguinarine ile Askorbik Asit kombinasyonlarının <i>S. aureus</i> izolatları üzerindeki etkisi.	33
Çizelge 4.4. Askorbik Asit ile Sanguinarine kombinasyonlarının MSSA izolatları üzerindeki FİK İndeksleri.	33
Çizelge 4.5. MSSA1 suşu üzerindeki Sanguinarine ve Askorbik Asit kombinasyonlarının etkisi.	37
Çizelge 4.6. MSSA2 izolatı üzerindeki Sanguinarine ve Askorbik Asit kombinasyonlarının etkisi.	41
Çizelge 4.7. MSSA3 izolatı üzerindeki Sanguinarine ve Askorbik Asit kombinasyonlarının etkisi.	45
Çizelge 4.8. MSSA4 izolatı üzerindeki Sanguinarine ve Askorbik Asit kombinasyonlarının etkisi.	49
Çizelge 4.9. Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA1 suşunun biyofilm üretimi üzerindeki etkisi.....	51
Çizelge 4.10. Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA2 izolatının biyofilm üretimi üzerindeki etkisi.....	53
Çizelge 4.11. Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA3 izolatının biyofilm üretimi üzerindeki etkisi.....	56
Çizelge 4.12. Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA4 izolatının biyofilm üretimi üzerindeki etkisi.....	58
Çizelge 4.13. Sanguinarine ve Askorbik Asitin bileşenlerinin MSSA1 suşunun olgun biyofilmi üzerindeki etkisi.	60
Çizelge 4.14. Sanguinarine ve Askorbik Asitin MSSA2 izolatının olgun biyofilmi üzerindeki etkisi.	61
Çizelge 4.15. Sanguinarine ve Askorbik Asitin MSSA3 izolatının olgun biyofilmi üzerindeki etkisi.	63

Çizelge 4.16. Sanguinarine ve Askorbik Asitin MSSA4 izolatının olgun biyofilmi üzerindeki etkisi. 65



ÖZET

SANGUİNARİNE ve ASKORBİK ASİT KOMBİNASYONLARININ İCA-BAĞIMLI BİYOFİLM ÜRETEEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Nozokomiyal ve toplumsal kaynaklı enfeksiyonlara sebep olan *Staphylococcus aureus* 'ların (*S. aureus*) son yıllarda prevalansı artmıştır. Biyofilm ilişkili enfeksiyonlara neden olan olup, *S. aureus* 'ların tedavileri zordur. Bu çalışmada, farklı etki mekanizmalarına sahip ajanların, biyofilm üreten *S. aureus* 'lar üzerindeki kombinasyon uygulamaları ile daha düşük dozlarda daha etkili tedavi olanağı yaratmak hedeflenmiştir. Çalışmamızda biyofilm oluşturan metisilin duyarlı *S. aureus* 'da (MSSA), *icaA*, *icaD*, *blaZ*, *blaI*, *blaR1* ve *atl* genlerinin varlığı tespit edildikten sonra, izolatlar üzerindeki sanguinarine ve askorbik asitin minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonları (MBK) belirlendi. Planktonik *S. aureus* klinik izolatlarına karşı dozları 8 kat MİK ile 16 kat alt-MİK arasında değişen 8 farklı doz içeren sanguinarine ve askorbik asit kombinasyonlarının antibakteriyel ve antibiyofilm aktiviteleri sırasıyla, dama tahtası ve MtP yöntemiyle araştırıldı. Ayrıca MBEK metoduyla, MİK'in 1/16 kat alt-MİK' erini içeren ajanların tek ve kombinasyonlarının sesil *S. aureus* 'lar üzerindeki etkisi araştırıldı. 1/4 MİK sanguinarine ve askorbik asitin tek ve kombine uygulamalarının, inkübasyonun 12 saat sonunda, Sesil *S. aureus* izolatlarının *icaA*, *icaD* ve *atl* genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerine etkileri gözlemlendi. Planktonik izolatlarda sanguinarine ve askorbik asitin tek ve kombine etkilerine bakıldığında MSSA1, MSSA2, MSSA3 ve MSSA4 izolatlarının FİK değerleri sırasıyla 0,745, 0,745, 0,920, 0,699 olarak tespit edilip, kısmi sinerjistik etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Ajan kombinasyonlarının biyofilm oluşumunu ve olgun biyofilmi azalttığı gözlemlenmiştir. MSSA izolatlarının gen ifadelerinde azalma gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, sanguinarine ile askorbik asit kombinasyonları, ica-bağımlı biyofilm üreten *S. aureus* enfeksiyonlarında, alternatif bir tedavi opsiyonu olabilir.

Anahtar Kelimeler: *S. aureus*, İca-bağımlı biyofilm, Sanguinarine, Askorbik Asit, Sinerji

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SANGUINARINE AND ASCORBIC ACID COMBINATIONS AGAINST ICA-DEPENDENT BIOFILM PRODUCING STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATES

The prevalence of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), which causes nosocomial and community-acquired infections, has increased in recent years. The treatment of *S. aureus* which causes biofilm-associated infections are difficult. In this study, it was aimed to create more effective treatment options with lower doses of agents by using combination treatments of agents having distinct action mechanisms against biofilm-producer *S. aureus*. In our study, after the presences of *icaA*, *icaD*, *blaZ*, *blaI*, *blaR1* and *atl* genes in biofilm producer methicillin sensitive *S. aureus* (MSSA) isolates were detected, MICs and MBCs of sanguinarine and ascorbic acid against isolates were determined. Antibacterial and antibiofilm activities of sanguinarine and ascorbic acid combinations containing 8 different doses of agents, starting from 8 fold of MIC to 16 fold of sub-MIC against planktonic *S. aureus* clinical isolates were investigated by checkerboard and MtP methods, respectively. In addition, the effects of sole and in combinations of agents containing 16 sub-MIC were investigated against sessile *S. aureus* by MBEC method. The effects of sole and combined treatments of 1/4 MIC sanguinarine and ascorbic acid against expression levels of *icaA*, *icaD* and *atl* genes of sessile *S. aureus* isolates were observed after 12 hours of incubation. When the sole and combined effects of sanguinarine and ascorbic acid against planktonic isolates were examined, the FIC indexes of MSSA1, MSSA2, MSSA3 and MSSA4 isolates were found to be 0.745, 0.745, 0.920, 0.699, respectively, with partial synergistic effects. It was observed that agent combinations reduce biofilm formation and mature biofilms. It was also observed that the reductions in *icaA*, *icaD* and *atl* gene expression levels of MSSA isolates. According to the results of the study, sanguinarine and ascorbic acid combinations may be an alternative treatment option in ica-dependent biofilm-producer *S. aureus* infections.

Keywords: *S. aureus*, Ica-dependent biofilm, Sanguinarine, Ascorbic Acid, Synergism

1. GİRİŞ

Staphylococcus aureus, nozokomiyal enfeksiyonların çoğunluğundan sorumlu olup, endokardit, osteomyelit, artrit, toksik şok, sendromu, gıda zehirlenmesi, yara enfeksiyonları, sepsis ve yabancı cisim enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Kırmusaoğlu, 2017). Gelişen teknoloji ile implant uygulanan hastalarda hastaya takılan implanta bağlı olarak tıbbi cihaz kaynaklı enfeksiyonlarda en yaygın görülen patojenler arasında *S. aureus* ve *S. epidermidis* görülmektedir. Tıbbi cihaz kaynaklı enfeksiyonlarda, bakterilerin ürettikleri biyofilm ile cihaz yüzeyine yapışması sonucunda hastanın morbidite ve mortalitesini önemli ölçüde etkiler. Stafilocokların oluşturduğu biyofilm yapısı biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların en sık nedenidir (Davies, 2003; Otto, 2013). Biyofilmin sahip olduğu matriks yapısı ve diğer özellikleri, hastanın immün sistemine ve antimikrobiyal tedaviye direnç göstererek, tedavide yanıt alınmasını oldukça güçleştirir (O’Gara and Humphreys, 2001). Bu yüzden yeni antimikrobiyal ajanların bulunmasına ihtiyaç vardır. *S. aureus* ve *S. epidermidis*’lerde biyofilm oluşumunda en çok incelenen iki mekanizma vardır. Bunlardan ilki *icaADBC* lokusundaki *icaA* geninden transle edilen polisakkarit intraselüler adezin (PIA) veya poli-N-asetil glukozamindir (PNAG). Diğeri ise *ica* operonundan bağımsız biyofilm oluşumudur (Joo and Otto, 2012). Polisakkarit matriksi, stafilocok yüzey proteinleri, hücre dışı DNA (eDNA), teikoik asitler ve hücre dışı maddeler biyofilm yapısının içeriğini oluşturur (Bose et al., 2012). Biyofilm yapısının içerisine gömülü olan sesil bakterilere antibiyotik ve türevi ilaçların etki etmesi güçtür. Gerek direnç kazanan bakteriler gerekse biyofilme gömülü olan bakterilere karşı uygulanan tedavilerin güçleşmesi, bilim insanlarının bu bakterileri karşı yeni tedavi yöntemleri, yeni kimyasal bileşenler araştırmaya yöneltmektedir. Dirençli bakteriler ve biyofilm oluşturan bakteriler ile mücadele için kullanılan ilaç ve kimyasalların kombinasyonları denenerek tedavilere olumlu yanıtlar beklenmektedir. Biz de yaptığımız bu çalışmamızda sanguinarine (SAN) ve askorbik asit (AA) bileşenlerinin tek başlarına ve çeşitli dozlardaki kombinasyonlarının, türe özgü genlerinin tayini ile tanısı konulan ve *ica*-bağımlı biyofilm üreten *Staphylococcus*

aureus izolatları üzerindeki antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerine bakılıp, virulans genlerinin ekspresyonları değerlendirilmiştir.

İca-bağımlı biyofilm üreten *Staphylococcus aureus* izolatlarının, antibiyotiklere duyarlılıkları az olduğundan ve inhibisyonları için antibiyotik direncine sebep olabilecek yüksek dozlar gerektiğinden dolayı, bunu önlemek için çeşitli dozlardaki sanguinarine ve askorbik asit bileşenlerinin kombinasyonları ile antimikrobiyal duyarlılıklarının artırılarak, biyofilm ve virulans faktörlerinin, *icaA*, *icaD* ve *atl* gen ekspresyonları üzerindeki etkilerine bakılıp, etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır (Atshan et al., 2013).

Şimdiye kadar yapılmış çalışmalarda, çeşitli antimikrobiyal ajanların stafilokoklardaki etkinliklerine bakılmış fakat farklı hedefteki ajanların kombine kullanımları ile bakterilerin antimikrobiyallere karşı duyarlılıkları artırılarak, infeksiyonun ilerlemesinde rolü olan biyofilm regülasyonu üzerindeki etkinliklerine eş zamanlı olarak bakılmadığı görülmüştür. Bu tez çalışmasında, sanguinarine ve askorbik asit bileşenlerinin ve bunların kombinasyonlarının, ica-bağımlı biyofilm üreten *Staphylococcus aureus* izolatları üzerindeki antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliklerinin, çeşitli mikrobiyolojik ve biyokimyasal metotlarla birlikte moleküler düzeyde de araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epidemiyoloji

Stafilokoklar ilk defa İskoç bir cerrah olan Alexander Ogston tarafından insan irininden 1880 yılında izole edilmiştir. İsmi staph (üzüm salkımı) ve kok'tan oluşturulmuştur. Çünkü *S. aureus* bakterileri mikroskopla incelendiğinde üzüm salkımı şeklinde, mor, yuvarlak, küme halinde görüntülenirler (Licitra, 2013). 1886 yılında iki staphylococcus suşu Alman bir cerrah olan Anton J. Rosenbach tarafından izole edilmiştir (Rosenbach, 1884). Bunlardan biri de pigmentli koloniler oluşturan *S. aureus* bakterisidir. Aureus Latincece altın rengi anlamına gelmektedir (Chambers and DeLeo, 2009).

2.1.1. Stafilokokal Biyofilmlerinin Tıbbi ve Epidemiyolojik Önemi

Stafilokoklar insan derisi ve mukozasında yaşayan konakçı bakterilerdir. Hastane surveyans sistemi, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda *Staphylococcus aureus* ve koagulaz negatif stafilokokların patojen bakteriler olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Koagulaz Negatif Stafilokoklar (KNS'ler) doğal kapak enfektif endokarditine ve prostetik kapak enfektif endokarditine neden olan enfektif ajanlardır. Stafilokokların büyük çoğunluğu, tıbbi cihazlarda biyofilm yapısı oluşturarak insanları enfekte etmektedirler. Stafilokok bakterileri çoğunlukla medikal müdahale esnasında medikal cisim ve çevre dokunun kontamine edilmesiyle yüzeylere nüfus ederek enfekte etmektedir. Stafilokoklar, biyofilmleri ile abiyotik (medikal cihazlar gibi) ve biyotik (konak hücre) gibi yüzeylere yapışıp, kolonize olurlar. Çok çeşitli kimyasal ve biyolojik yüzeylerde biyofilm oluştururlar.

Bu şekilde kendilerini immün sisteme ve buldukları konağın antimikrobiyal bileşenlerine karşı korurlar. Günümüzde biyofilm üreten stafilokok türleri çoğunlukla hastanelerde izole edilmekte ve birçok kayıplara neden olmaktadır (Otto, 2008; Jan-Roblero et al., 2016; Kırmusaoğlu, 2016). Biyofilm oluşturan bakteriler antibiyotiklere ve birçok antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gösterirler. Biyofilme gömülü bakteriler, biyofilm matriksinde bulunan antibiyotikleri yıkan enzimler ve otolizin tarafından

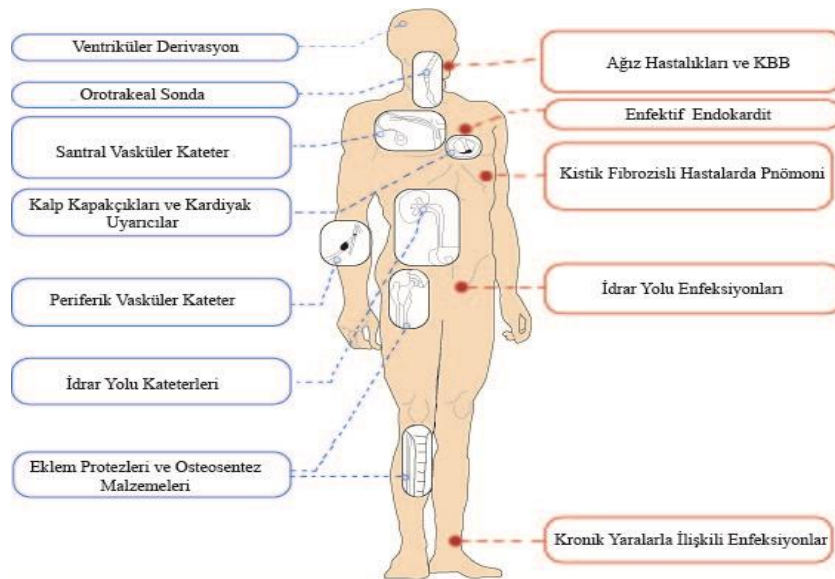
açığa çıkan eDNA ile antibiyotik direnci kazanırlar (Stoodley et al., 2002; Bjarnsholt et al., 2011).

2.2. Stafilokok Biyofilmlerinin Patogenezi

Biyofilm yapısının, stafilokokların neden olduğu enfeksiyonların patogenezinde önemli bir rolü vardır. Biyofilm yapısı, bakterilerin yaşama için uygun olmayan ortamlarda örneğin ultraviyole (UV) hasarı, bakteriyofajlar, metal toksisitesi, kuruma, tuzluluk, pH gradyanları, amipler gibi stres koşullarında hayatta kalmasını sağlar (Plata et al., 2009). Aynı zamanda, antibiyotiklere, antimikrobiyal ajanlara ve konakçı immün sistemine karşı da koruma sağlayarak bakterilerin uygun olmayan koşullarda hayatta kalmasını sağlar (Kırmusaoğlu, 2016). Biyofilmle ilgili ilk enfeksiyon bildirimini hastaya implante edilen kalp pilinin kontaminasyonu ile ilgilidir. Ablasyon sonrası kalp pilinin elektron mikroskopunda görüntülenmesiyle, ilk kez bir materyal enfeksiyonunun patogenezinde biyofilm görüntülenmiştir (Marrie et al., 1982). Yaşlanan nüfusun artması ve implante cihaz ve malzemelerin kullanımının artması ile biyofilm oluşturan bakterilere maruz kalan hasta sayısı artmaktadır (Hetrick and Schoenfisch, 2006; Rodrigues, 2011). Biyofilm ilişkili enfeksiyonlar, hastaya implante edilen tıbbi malzeme ya da kronik enfeksiyonlardan kaynaklı olabilir. Kronik enfeksiyonlarda hastanın kullandığı antibiyotiklerin planktonik bakterilere etki etmesi, biyofilme gömülü bakterilere etki etmemesi sonucunda kronik enfeksiyon gelişir (Costerton et al., 1999).

Kronik enfeksiyonlarda görülen infektif endokardit, kalbin endokardiyal yüzeyinin enfekte olması sonucunda, kalp kapaklarını etkileyen bir hastalıktır. İnfektif endokardit tanısının zorluğu yanı sıra, yüksek morbidite ve mortaliteye neden olması nedeniyle önemli bir hastalıktır. İnfektif endokarditin en önemli etkenlerinden biri de *S. aureus*'tur. *S. aureus*'a bağlı infektif endokarditlerde kapak halkası apsesi, myokard apsesi, pürülan perikardit daha sık görülen etkendir. Stafilokokların neden olduğu endokarditin etkeni doğal kapaklarda çoğunlukla metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) iken, yapay kapaklarda ise *S. epidermidis*'tir. Otozomal resesif genetik bir hastalık olan kistik fibroz hastalığında hastaların, normal sağlıklı bireylerin burun florasında

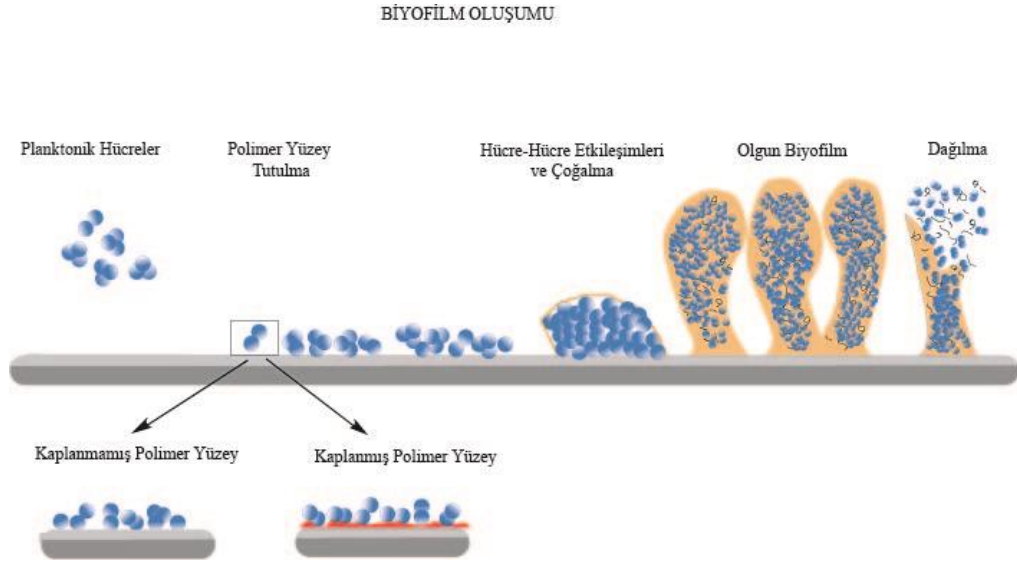
bulunan *S. aureus* bakterisine akciğerlerinde rastlanmıştır. Alt solunum yolunda bulunması patolojik bir durumun göstergesidir. Solunum fonksiyonlarının bozulması, bol mukus oluşumu bakteriyel kolonizasyonu desteklemektedir (Lyczak et al., 2002). Biyomateryal implantların total diz ve kalça artroplastilerinin yüzeylerinde de biyofilm oluşmaktadır (Darouiche, 2004; Fowler et al., 2015). Tüm implante malzemeler ve cihazlar; vasküler ve idrar sondaları, orotrakeal tüpler, kalp pilleri ve protez kalp kapaklarında ortopedik ve implantlarda (eklem protezleri vs.) biyofilm gelişimi, biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların riskini artırır (Darouiche, 2004; Habib et al., 2009; Baddour et al., 2010). Kronik idrar yolu enfeksiyonlarında uzun süreli sonda veya katater kullanımına bağlı olarak gelişen biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar, hasta tedavisinde zorluklara neden olmaktadır. Cerrahi işlem öncesi ve sonrası olası kan kaynaklı bulaş, cihaz içi ve dış çevre ile temas, deriyle temas eden ekipmanların çıkması (idrar kataterleri veya kataterler) gibi, hastanın biyofilm oluşturan bakterilerle temasına ve buna bağlı enfeksiyonlara neden olurlar. Deri florasında bulunan stafilkokların, implantasyon da dahil tıbbi müdahale esnasında implanta veya dokuya kontaminasyonu biyofilm ilişkili enfeksiyonların kaynağıdır. Stafilkokların biyofilm oluşturma özelliği, önemli bir hastane patojeni olarak ortaya çıkışını açıklar (Rodrigues, 2011; Lebeaux and Ghigo, 2012) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Biyofilmlerle ilişkili temel enfeksiyonlar (Lebeaux and Ghigo, 2012).

2.3. Stafilokok Biyofilmleri ve Virülans Faktörleri

Biyotik veya abiyotik yüzeylere tutunmuş olan biyofilm, sesil (biyofilme gömülü bakteriler) mikroorganizma topluluklarının gömülü olduğu slime (mukus) benzeri bir glikokalikstir. Bu hücre dışı polimerik yapı, biyofilm üreten mikroorganizmalar tarafından üretilip, polisakkarit matriksi, teikoik asitler, eDNA ve stafilokok proteinlerinin matriksinden oluşur (Donlan and Costerton, 2002; Flemming and Wingender, 2010; Archer et al., 2011; Kırmusaoğlu 2016). PIA anyonik bir fraksiyonu olan ve fosfat içeren spesifik bileşiği (%80-85) β -1,6- bağlı N-asetilglukozamin bileşiklerinden oluşan ester bağlı spesifik polisakkarittir (Archer et al., 2011). PIA *S. aureus* ve *S. epidermidis*'te biyofilm oluşumunun temel mekanizması olmasına rağmen, yüzey proteinleri de biyofilm oluşumunu sağlayan diğer alternatif bir mekanizmadır. Hücre içi matriksinde geniş su içeren kanallar ve bu kanallarda β -laktamazlar gibi antibiyotik parçalayıcı enzimler bulunur (Anderl et al., 2000). PIA, eDNA'yı oluşturan adaptif direnç mekanizmalarında rol oynar (Mulcahy et al., 2008) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Stafilokokal biyofilm oluşumu ve ilgili faktörler (Vuong and Otto, 2002).

2.4. Biyofilm Oluşum Mekanizmaları

Bakteriyel biyofilm oluşumu oldukça karmaşık ve birçok faktörün birlikte gerçekleştiği bir oluşum sürecidir. Biyofilmin ilk oluşum aşaması tek hücrelerin, çözültiden yüzeye tutunmasıyla başlar. Mikrobiyal hücreler çözültiden çıkarak yüzeye çarpar ve yapışır. Yüzeye yapışan hücreler, ekzopolisakkaritler (EPS) üreterek biyofilm formunu oluşturarak yüzeylere yapışır. Bu formdaki bakterilere sessil evre bakterileri denir. Diğer hücreler yüzeye yapışmayıp, yüzeyden ayrılır. Yapışmayan bu hücrelere planktonik evre bakterileri denir. Yüzeye yapışan hücrelerin ilk kolonizasyonu gerçekleşir. Biyofilm siklusü, Yüzeye tutunma-yapışma (adezyon), hücre-hücre adezyonu, kümeleşme (proliferasyon), olgunlaşma ve dağılma evrelerinden oluşur (Otto, 2013; Lewandowski and Beyanal, 2013; Kırmusaoğlu, 2016).

2.4.1. Aderans/Adezyon (Yapışma) Aşaması

Biyofilm oluşması için uygun koşullar gerçekleştiğinde, bakterilerin yapışma için substrat görevi gören bir yüzeye yapışması ile başlayan biyofilm oluşum süreci, hücre-hücre adezyonunun oluşturduğu proliferasyon (birikim) ile devam eder (Kuroda et al., 2008).

İlk evrede, stafilokok kolonileri, yüzey proteinleri ile implant materyallerinin polimer olan yüzeylerine doğrudan bağlanırlar ya da daha önceden konak proteinleri ile kaplanmış olan polimer yüzeylere bağlanırlar (Vuong and Otto, 2002). Bakterilerin plastik olan yüzeye bağlanması plastiğin fiziko kimyasal özelliklerine ve bakterinin yüzeyine bağlıdır. Stafilokoklar hidrofobik olduğu bilinen plastik yüzeylere yapışırlar. Stafilokoklar, hidrofobik plastik yüzeylerle benzer özellikler gösteren biyomateryallere benzer şekilde yapışırlar (Gottenbos et al., 2000). Bakteriyel adezyonu belirleyen ana parametre, bakteri yüzeyinin hidrofobik olmasıdır (Vacheethasane, 1998). Birincil yapışmadan sonra, bakteri hücreleri çoğalır çoğalan hücreler arasında etkileşim sağlayan slime olarak bilinen hücre dışı biyofilm matriksi üretilir (Cramton et al., 1999).

2.4.2. Olgunlaşma Aşaması

Stafilokokların biyotik ve abiyotik yüzeylere adezyonundan sonra, *ica* operonu (*ica*-bağımlı) tarafından transkribe edilen PIA veya PNAG gibi EPS (ekzopolisakkaritler) üretilmeye başlanır. Hücre dışı matriks (ECM) PIA/PNAG, eDNA ve *ica*-bağımsız formda yüzey proteinleri (hücre duvarı bağlantılı (CWA)) ve bakteri toplulukları olgunlaşır. Hücre duvarı bağlantılı CWA proteinleri hem bakteriyel yapışma sağlar hem de hücreler arasında yapışma, biyofilm birikimi ve olgunlaşma sağlar (Speziale et al., 2014). *S. aureus* bakterisinin *icaADBC* operonu, *ica* genlerini bulundurmaktadır (Cramton et al., 1999). *Ica* lokusu “aksesuar genleri” olarak bilinen *icaADBC* genlerini lokusunda barındırır. *S. aureus* biyofilm matriksinin büyük bir bileşeni olan PNAG gen ürünleri *icaADBC* lokusu tarafından sentezlenmektedir. *IcaA*, kısa PNAG polimerlerini kodlar (Arciola et al., 2015).

Çok katmanlı biyofilmler oluşana kadar hücre kümeleşmesi (proliferasyon) gerçekleşir. Kümelenme faktörleri A ve B (ClfA ve ClfB), *S. aureus*'teki fibrinojen/fibronektin-bağlanma proteini FnbpA ve FnbpB veya *S. epidermidis*'teki fibrinojen bağlanma proteini Sdr/Fbe gibi stafilokoklardaki farklı yüzey proteinleri bakterilerin primer olarak bağlanmasına aracılık eder. Ayrıca yüzey proteinleri, hücreler arası adezyonu destekler ve PIA'dan ziyade *ica*-bağımsız biyofilm oluşumunda, bakterilerin proliferasyonunu sağlar (Foster, 2014). Hareketli bakterilerin ilk hücre yüzey etkileşimlerinde sahip oldukları kamçıdan (flagella) dolayı hareketli hücrenin yüzeye yapışması kolaylaşır. Yapışmanın ardından biyofilmde hücreler farklılaşmaya giren hareketli türler, kamçılarını felç eder ve hareket kabiliyetlerini kaybederek hareketsiz hale geçerler (Spormann, 2008).

2.4.3. Dağılma Aşaması

Dağılma aşamasında, sessiz bakteriler, diğer yüzeylere yayılıp, kümeleşen ve bu enfekte olmuş bölgeler üzerinde biyofilm oluşturabilen, planktonik evreye geçerler (Stoodley, 2002).

Proteazlar, nükleazlar tarafından bakteri kaynaklı adezinlerin çözülmesi ve bir fenol-soluble modulin (PSM) olarak bilinen küçük bir grup amfilik α -heliks peptid gibi biyofilm matriksini parçalayıcı enzimlerin biyofilm matriksini parçalaması,

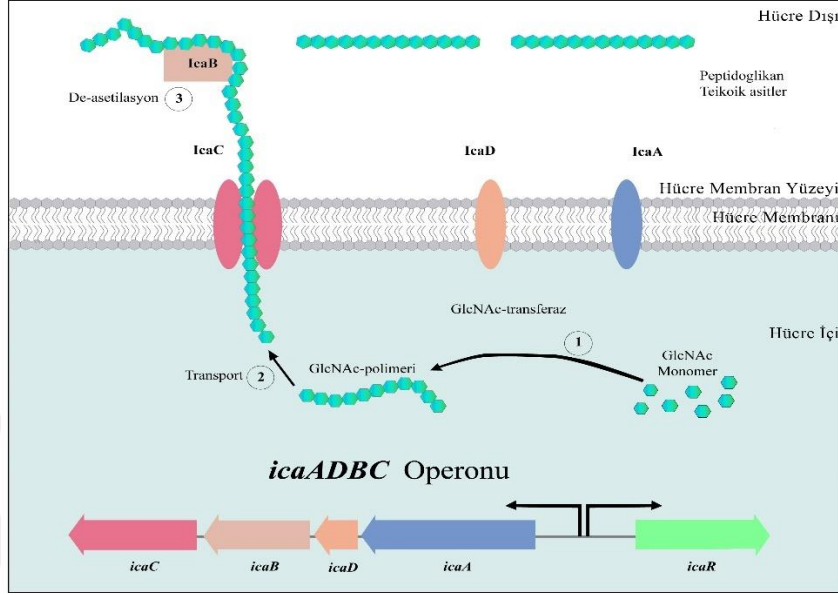
mikroorganizmaların biyofilmden ayrılmasına neden olur (Speziale et al., 2014; Kırmusaoğlu, 2016). Aynı zamanda quorum sensing (çevreyi algılama sistemi) veya korozyon ve insan müdahalesi gibi dış etkenler de biyofilmden mikroorganizmaların ayrılmasına neden olurlar (Kaplan, 2010).

2.5. Biyofilm Oluşum Tipleri

2.5.1. PIA Bağımlı Biyofilm Oluşumu

Stafilokoklar biyotik ve abiyotik yüzeylere yapıştıktan sonra hücrelerin yapışmasından sorumlu olan ve kimyasal yapısına göre adlandırılan PNAG ve PIA yapıları *ica* operonu (*ica*-bağımlı) tarafından sentezlenirler (Mack et al., 1996). Pozitif yüklü olan PIA, negatif yüklü olan bakteri hücre yüzeyi ile elektrostatik bir etkileşim ile birbirlerine bağlanır. Anaerob koşullar, PIA ekspresyonunu artırır. Oksijen konsantrasyonu kan dolaşımında arttıkça biyofilm üretimi sınırlanır, bu da biyofilm oluşumunu olumsuz etkileyen çevresel koşullardan biridir. Oksijen miktarının önemli derecede azaldığı koşullarda biyofilmde PIA ekspresyonunda artış görülür (Rachid et al., 2000).

Tüm *icaADBC* genlerini içeren *S. aureus* suşları PIA üretimini gerçekleştirirler. *Ica* lokusu *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* genlerinden oluşur. *IcaA* ve *icaD* genleri ekzopolisakkarit sentezine yardımcı olur. Poli-N-asetilglukozamin polimerini (PIA) sentezleyen, N-asetilglukozamin transferaz *icaA* enzimini *icaA* geni kodlar. PIA, deasetile edilmiş β (1-6) bağıyla bağlanmış N-asetilglukozamin homopolimeri olan bir ekzopolisakkarittir. *IcaA* geni, membranda bulunan N-asetilglukozamin transferaz *icaA*'yı sentezler. Hücre membran proteini olan *icaD*, N-asetilglukozamin transferaz *icaA* enziminin aktivitesini sağlar. Hücre membran proteini olan *icaC*, *icaB*'ninde yardımıyla poli-N-asetilglukozamin polimerinin membranın dış yüzeyine transfer edilmesini sağlar. Membranın yüzeyinde bulunan *icaB*, hücre membranının dış yüzeyine transport edilen PIA'dan bazı N-asetil gruplarını kaldırır. Bu da yüzeye bağlanmada gerekli olan, polimere katyonik özellik kazandırır (Heilmann et al., 1996; Otto, 2008) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Ekzopolisakkarit PIA/PNAG oluşum mekanizması.

2.5.2. PIA Bağımsız Biyofilm Oluşumu

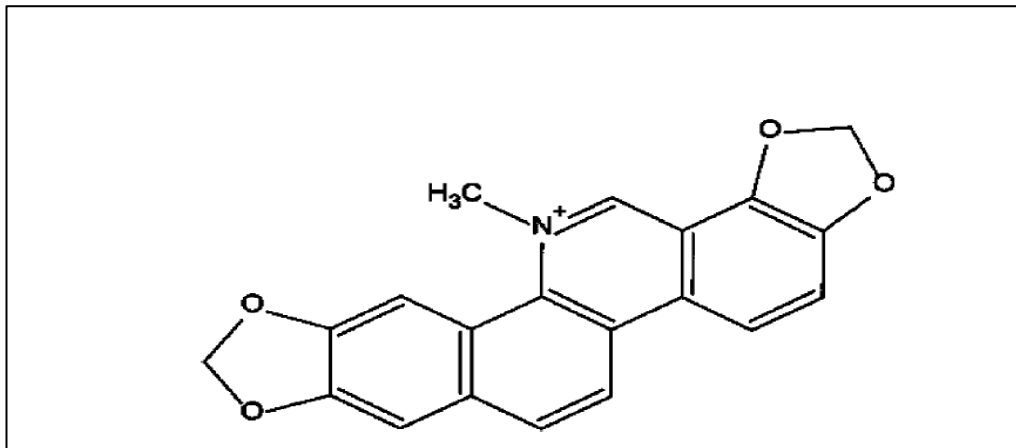
Ica gen lokusunun biyofilm oluşumundaki önemine rağmen, sadece ica-bağımlı PIA oluşumu ile biyofilm oluşmaz. Yapılan in vitro çalışmalarda *icaADBC* lokusu delesyona uğramış mutant bakterilerde biyofilm sentezi etkilenmemiştir. Ica lokusu delesyona uğramış mutant *S. aureus* bakterilerinde A proteininin (*SpA*) biyofilm üretimi için gerekli olduğu tespit edilmiştir. Fnb proteinleri (*fnbp*), otolizin (*atl*) ve *SigB* düzenlenmesi, *S. epidermis*'te PIA'dan bağımsız biyofilmlerin oluşumunda görev alırlar. *S. aureus*'larda biyofilm ilişkili protein olan Bap ve Bap ile ilişkili proteinleri, PIA'dan bağımsız olarak biyofilm gelişiminde rol alırlar (O'Neill et al., 2008). Biyofilmin önemli bileşenlerinden biri de eDNA'dır. Stafilokoklarda kontrollü hücre ölümü biyofilm gelişimini olumlu yönde etkilemektedir. Otolizi kontrol eden düzenleyici genlerden biri olan *CidR*, biyofilmleri etkilemektedir. *CidA* hücre lizisini etkileyerek, DNA'nın serbest kalmasını sağlayarak, biyofilm gelişimine etki eder (Rice et al., 2007).

2.6. Biyofilm İçerisinde Bulunan Mikroorganizmalarda Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Biyofilme gömülü bakteriler, antimikrobiyal ajanlara karşı planktonik bakterilerden daha dirençlidir. Biyofilmin neden olduğu antibiyotik direnci fizyolojik bir durumdur. Biyofilmler, mikrobiyal ajanların biyofilm içindeki bakterilere difüzyonunun azalması ve matriksde bulunan eDNA ve β -laktamaz gibi enzimlerden dolayı, biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisinde zorluklara neden olurlar (Kırmusaoğlu, 2016).

2.6.1. Sanguinarine (SAN)

Sanguinarine (SAN) (Şekil 2.4), Papaveracea ailesinin bitkilerinden elde edilen benzo[c]phenanthridine alkaloiddir. Antibakteriyel, antitümör, antiinflamatuvar ve antianjiogenez etkileri de dahil olmak üzere geniş kapsamlı farmakolojik etkileri vardır (Ahsan et al., 2007; Hou et al., 2013; Gu et al., 2015). Sanguinarine, benzilzokinolin alkaloitler grubundan bir kuaterner amonyum tuzudur. Afyon haşhaşının kök, sap ve yapraklarında bulunur ama kapsülünde bulunmaz. Sanguinarine Na^+ - K^+ -ATPase transmembran proteini üzerindeki etkisi nedeniyle hayvan hücrelerini öldüren bir toksindir (Hou et al., 2013; Gu et al., 2015).



Şekil 2.4. Sanguinarine kimyasal yapısı [13-metil-(1,3)-benzodioxolo(5,6-c)1,3-dioxolo-(4,5-i)phenanthridinium].

Sanguinarine Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerde hem proliferasyonu inhibe eder hem de DNA replikasyonunu etkilemeden sitokinezi bloke eder.

Sanguinarine bakteriyel sitokinezi inhibe ederek bakterilerdeki Z halkasının fonksiyonunu bozarak FtsZ proteininin inhibe olmasına neden olur (Beuria et al., 2005). FtsZ proteini filament sıcaklığına duyarlı mutant Z (FtsZ) bakteriyel hücre bölünmesi için gerekli olan temel bir proteindir. Bu proteine sahip olmayan mutant bakterilerde, filamentler uzamasına rağmen hücre bölünmesi gerçekleşmez. Bundan dolayıdır ki, yeni antibakteriyel ilaçların hedefini FtsZ proteini oluşturmaktadır (De Boer et al., 1992). FtsZ proteini bölünme bölgesinde toplanmaya başlayan ilk proteinlerden biridir. Hücre bölünmesi için gerekli olan diğer proteinler için bir iskele görevi görür bunun yanında FtsZ proteinin kendisi de hücre bölünmesine sebep olan sitokinetik kuvvetleri uygulayabilir (Romberg and Levin, 2003; Erickson et al., 2010; Mingorance et al., 2010).

2.6.2. L-Askorbik Asit

Biyofilm yapısının gelişimini inhibe etmek için, biyofilm inhibe edici aktivitesi olan bir kimyasal olarak Askorbik asit gıdadan ilaç sektörüne kadar birçok alanda kullanılmaktadır. Askorbik asit antibakteriyel etkinliğe sahip olduğundan dolayı gıda maddelerinin bozulmasını engellemek amaçlı kullanılan bir kimyasal maddedir. Antioksidan görevi görür ve bu nedenle oksijenin etkilerini inhibe ederek ürünleri korur (Russel, 1990). Son yapılan çalışmalar askorbik asitin başka kimyasallarla kombinasyonu sonucunda bakteri büyümelerini inhibe ettiği görülmüştür (Tajkarimi and Ibrahim, 2011). Askorbik asit R plazmidlerinin kaybına neden olur ve stafilokoklardaki antibiyotik direnç seviyelerini etkiler (Amábile-Cuevas et al., 1991; Amábile-Cuevas and Heinemann, 2004). Enterekoklarda β -laktamaz aktivitesini azalttığı gözlemlenmiştir (Shoeb et al., 1995).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Biyolojik Örneklerin Hazırlanması ve Mikrobiyolojik Analizleri

Çalışmamızda, kendi bakteri stoğumuzda bulunan 3 tane klinik kaynaklı ica-bağımlı biyofilm oluşturan metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) izolatları (MSSA2, MSSA3 ve MSSA4) ve ica pozitif kontrol suşu olarak ATCC 29213 (MSSA1) kullanıldı. Çalışma başlatılana kadar örnekler -80 °C derin dondurucuda (Haier Biomedical) muhafaza edildi. -80°C'de muhafaza edilen stafilokok klinik izolatları alınarak %2 NaCl içeren Mueller Hinton Broth (MHB; 1.10293.0500, Merck) sıvı besiyeri içerisine inoküle edilerek, 37 °C'de 24 saat boyunca inkübasyona (NÜVE, EN 500) bırakıldı (Saginur et al., 2006). MHB içine inoküle edilen bakteri örnekleri yeterli oranda çoğaltıldıktan sonra %5 kanlı agar (Gül Biyoloji Laboratuvarı) üzerine pasajlanarak 37 °C'de 24 saat inkübe edildi ve çalışmaya hazır duruma getirildi. Aynı zamanda çoğaltılan bakteri izolatları daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere otoklavda (121 °C, 15 dakika; BES) sterilize edilmiş, 1 mL skim milk besiyeri içeren 1,5 mL'lik eppendorf tüplere inoküle edilerek, -80 °C derin dondurucuda muhafaza edildi. 24 saat sonra inkübatörden çıkarılan bakteri örneklerinin mikroskopik morfolojilerine ve kanlı ve mannitol salt agarda koloni morfolojilerine bakılıp mat sarı-gri renkte ve β hemoliz yapan koloniler için katalaz ve koagülaz gibi mikrobiyolojik ve biyokimyasal identifikasyon testleri yapıldı ve BD Phoenix Bakteri identifikasyon cihazı (BD, Amerika) kullanılarak tanımlama yapıldı.

3.2. Stafilokok İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

3.2.1. Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Saptanması

Stafilokokların metisiline karşı direnç gösterip göstermediklerine, Kirby-Bauer disk difüzyon tekniği ile bakıldı (CLSI, 2013). Hazırlanan Mueller-Hinton Agar (MHA; 1054370500, Merck) besiyeri, otoklavlanarak (121 °C, 15 dakika) steril edildi ve 45-50°C sıcaklığa soğutuldu. 100 mm'lik polistiren petri kaplarına döküldü. Soğutulduktan sonra +4 °C'deki buzdolabına daha sonra kullanılmak üzere kaldırıldı.

%2 NaCl içeren 2 ml MHB bulunan steril cam deney tüplerinde 0.5 McFarland (1.10^8 cfu/mL) (Biosan, DEN-1 Densitometer) olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonları, steril eküvyon çubuğu ile MHA besiyerine yayılıp inokule edildi. Bakteri inokule edilmiş MHA besiyerlerine 30 µg sefoksitin diski (CT0119B, Oxoid) yerleştirildi. 37 °C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Sefoksitin için zon çapları 21 mm ve daha küçük olan izolatlar metisiline dirençli, 22 mm ve daha büyük zon çapları olanlar metisiline duyarlı kabul edildi (Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI, 2013).

3.2.2. Stafilocoklarda β-Laktamaz Varlığının Tespit Edilmesi

Stafilocoklarda β-laktamaz varlığı nitrosefin diski (171024N, Oxoid) ile tespit edildi. Çalışmada lam üzerine 1 damla steril distile su damlatıldı ve üzerine nitrosefin diski yerleştirildi. Diskin üzerine öze ile stafilocok kolonisinden alınıp sürüldü. Diskteki renk değişikliği 1 saat sonra gözlemlendi. Kırmızıya dönüşen diskler pozitif, renk değişikliği olmayan yani sarı renkte kalan diskler ise negatif olarak değerlendirildi (CLSI, 2013).

3.3. *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Gen Varlığının Tespiti

Sanguinarine ve askorbik asit kombinasyonlarının ica-bağımlı biyofilm üreten *S. aureus* izolatları üzerindeki etkilerinin incelenmesinin amaçlandığı bu tez çalışmasında, öncelikle *16S-rRNA* ve *nuc* gibi türe spesifik genlerin, *mecA* metisilin direnç geninin ve türe spesifik olarak belirlenmiş *icaA*, *icaD*, *atl*, *blaZ*, *blaR1*, *blaI* gibi virülans genlerinin varlığı genomik deoksiribonükleik asit (DNA) izolasyonunu takiben kalitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) ile tespit edildi.

3.3.1. Primer Tasarımı

Kalitatif GZ-PZR çalışmasında Çizelge 3.1'de belirtilen primer dizileri kullanıldı. Primerler, Primer BLAST ve Primer3 programları kullanılarak tasarlandı. Oligonükleotitlerin sentezi Sentromer DNA Teknolojileri Şirketi (Türkiye) tarafından gerçekleştirildi.

Çizelge 3.1. Kalitatif GZ-PZR çalışmasında kullanılan primer dizileri

Gen İsimleri	Primerler
<i>IcaA</i>	İleri Primer 5'-ACACTTGCTGGCGCAGTCAA-3'
	Geri Primer 5'-TCTGGAACCAACATCCAACA-3'
<i>IcaD</i>	İleri Primer 5'-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3'
	Geri Primer 5'-AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA-3'
<i>Atl</i>	İleri Primer 5'-TACCGTAACGGCGTAGGTCGT-3'
	Geri Primer 5'-CATAGTCGTGTGTGTGTACGA-3'
<i>Nuc</i>	İleri Primer 5'-CGTCAAGGCTTGGCTAAAGTT -3'
	Geri Primer 5'-GCGTTGTCTTCGCTCCAA -3'
<i>BlaZ</i>	İleri Primer 5'-CCTGCTGCTTTCGGTAAG-3'
	Geri Primer 5'-TCAGCCACCTTACAGTCTTTT-3'
<i>BlaR1</i>	İleri Primer 5'-TTGCTTGAGTTGAGTCGCAG-3'
	Geri Primer 5'-GCTATGTTTGGACTTGACCGAC-3'
<i>BlaI</i>	İleri Primer 5'-TATCTATGGCTGAATGGGATGTT-3'
	Geri Primer 5'-TTTCATGTCCCCTCCATACAG-3'
<i>16S rRNA</i>	İleri Primer 5'-CGTGCTACAATGGACAATACAAA-3'
	Geri Primer 5'-ATCTACGATTACTAGCGATTCCA-3'
<i>MecA</i>	İleri Primer 5'-CATGAACAAGAACAGCCCCGC-3'
	Geri Primer 5'-AGCGTCTACGCCATCTTCAC-3'

3.3.2. Genomik DNA İzolasyonu

-80 °C derin dondurucuda muhafaza edilen örnekler kanlı agara pasaj alınarak 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonra pasaj alınan stafilocok koloni örneklerinden bir koloni alınarak 10 mM Tris/klorür ve 0,5 mM EDTA (pH:9) içeren 1 ml tampon solüsyonunda süspansiyon edildi. Bakteri DNA'sının elde edilmesinde EZ1Virus Mini kit v2.0 DNA Safılaştırma Kiti ile EZ1 Advanced XL (QIAGEN, Almanya) izolasyon cihazı kullanıldı. Elde edilen DNA'lar uzun süre saklanmak üzere -80 °C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.3.3. Kalitatif GZ-PZR Reaksiyonu

Bölüm 3.1’de belirtilen stafilokok koloni örneklerinden gerçekleştirilen DNA izolasyonu sonrası, Çizelge 3.1’de belirtilen genlerin varlığı, SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline, BIO-98005) protokollerine uygun Çizelge 3.2’de belirtilen GZ-PZR reaktifleri varlığında Çizelge 3.3’te belirtilen GZ-PZR koşullarında GZ-PZR cihazı (BIO-RAD, CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System) ile incelendi.

Çizelge 3.2. GZ-PZR reaktifleri

Reaktif	Stok Konsantrasyon	Hacim (µl)
SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit	2X	10
İleri Primer	10 µM	1
Geri Primer	10 µM	1
DNA	20 ng/µL	2
Su	-	6

Çizelge 3.3. GZ-PZR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Polimeraz Enzim Aktivasyonu	95 °C	5 dk	
Denatürasyon	95 °C	10 sn	
Bağlanma	60 °C	10 sn	45
Uzama	72 °C	30 sn	
Erime Eğrisi Analizi	65 °C-95 °C	5 sn	

3.4. Biyofilm İdentifikasyonu

3.4.1. Tüp Metodu (TM)

Biyofilm oluşturan bakteri örneklerinin kalitatif olarak tespit edilmesinde tüp metodu deneyi yapıldı. Tüp metod yöntemi için -80 °C’de muhafaza edilen stafilokok izolatları derin dondurucudan alınarak %5 kanlı agar besiyerine öze yardımıyla ekildi. Ekimi yapılan bakteri izolatları 37 °C’de 24 saat inkübe edilerek çalışmaya hazır duruma getirildi. 24 saat sonra inkübatörden çıkarılan bakteri kolonileri %2 NaCl, ile %1 glikoz içeren MHB besiyerine inoküle edilip 0.5 McFarland (1.10^8 cfu/mL) yoğunluğunda olacak şekilde ayarlandı (Saginur et al., 2006; Stepanović et al., 2007). Steril polistiren test tüplerine 0.5 McFarlanda ayarlanmış bu bakteri süspansiyonları aktarılıp 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası polistiren tüplerin içerisindeki planktonik bakteri süspansiyonları dökülüp, tüpler yıkandıktan sonra içerisine safranin boyası (94635-250ML-F, Sigma) eklenerek tüp duvarlarında biyofilm oluşturan bakterilerin boyanması sağlandı. Bir saat safraninde bekletildikten sonra, tüplerden safranin boyası döküldü. Biyofilm oluşturan bakterileri içeren polistiren tüpler, 2 kez steril fosfat tamponu (PBS; 14190094, Thermo Fisher Scientific) ile yıkanarak ters olarak kurumaya bırakıldı. Kuruma işlemi sonrasında polistiren tüplerin duvarlarının ve dibinin boyanması ve üst yüzeyde gözlemlenen halka, bakterinin biyofilm oluşturduğunu gösterir (Christensen et al., 1985).

3.4.2. Mikrotitre Plak (MtP) Metodu

Bakteri süspansiyonları %2 NaCl ve %1 glikoz eklenen MHB içerisinde 1.10^8 cfu/mL bakteri olacak şekilde 0,5 McFarland’a ayarlandı (Saginur et al., 2006; Stepanović et al., 2007). Bu bakteri solüsyonları, ilk test tüpünde 20 kat (1/20), dilue edilerek bu tüpteki son konsantrasyon 5.10^6 cfu/mL olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra %1 glikoz ile %2 NaCl içeren 180 µL MHB besiyeri ve 20 µL bakteri solüsyonu (5.10^6 cfu/mL) 96 kuyucuklu polistiren mikrotitre plaklara (CLS3595, Sigma-Aldrich) dağıtılıp, bu kuyulardaki son bakteri konsantrasyonu 5.10^5 cfu/mL olarak ayarlandı (1/10 kat dilüsyon). Mikrotitre plakları 24 saat 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra planktonik içerik dökülüp mikrotitre plaklar 2 kere PBS ile yıkandı. Yıkamadan

sonra mikrotitre plaklar kurumaya bırakıldı ve daha sonra, 150 µL metanol ile 20 dakika fikse edildi. Mikrotitre plaklar, fiksasyon işleminden sonra 15 dakika boyunca 150 µL safranine tabi tutuldu (Christensen et al., 1985). 15 dakika sonrasında safranin aspire edildi. Daha sonra mikrotitre plaklar 2 kez fosfat tamponu (PBS) (pH 7.2) ile yıkandı. Mikrotitre plaklar yıkama işlemi bittikten sonra oda ısısında kurumaya bırakıldı. Kuruyan mikrotitre plaklar 570 nm absorbansta mikrotitre plak okuyucu cihazında okutuldu (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific.). Negatif kontrol olarak blank kullanıldı (%2 NaCl ve %1 glikoz eklenen 200 µL MHB). İzolatların biyofilm miktarını belirleyip, kıyaslamak için OD_c değerleri hesaplandı (Christensen et al., 1985; Kırmusaoğlu, 2019).

$$OD_c = OD_{ort} \text{ (negatif kontrol)} + 3 \times SD_{negatif kontrol}$$

$$OD_{İZOLAT} = OD_{ORTALAMA} - OD_c$$

Sonuçlar aşağıdaki verilere göre değerlendirilmiştir.

$OD \leq OD_c$	Biyofilm üretimi yok
$OD_c \leq OD \leq 2 \times OD_c$	Zayıf biyofilm üretimi
$2 \times OD_c \leq OD \leq 4 \times OD_c$	Orta biyofilm üretimi
$4 \times OD_c \leq OD$	Güçlü biyofilm

Biyofilm olmayanlar (0), zayıf biyofilm oluşturanlar (+ veya 1), orta biyofilm oluşturanlar (++ veya 2), güçlü biyofilm oluşturanlar (+++ veya 3) şeklinde gösterilmiştir (Stepanović et al., 2007).

3.5. Bakteri Süspansiyonlarının ve Kimyasalların Hazırlanması

3.5.1. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

Bakteri kolonileri %2 NaCl ile %1 glikoz içeren MHB içerisine inoküle edildi. Bakteri yoğunluğu 0.5 McFarland (1.10^8 cfu/mL) olacak şekilde hazırlandı (Saginur et al., 2006; Stepanović et al., 2007). Bu hazırlanan bakteri solüsyonları 20 kat (1/20) dilue edilerek, 5.10^6 cfu/mL yoğunlukta bakteri solüsyonları elde edildi. Bakteri solüsyonları tek ajan uygulamaları için, 10 kat (1/10) dilue edilerek son konsantrasyon 5.10^5 cfu/mL olacak şekilde hazırlandı (NCCLS, 1999).

3.5.2. L-Askorbik Asit Hazırlanması

Saflık derecesi %99 olan L-askorbik asit bileşiği Sigma Aldrich (A92902-25G) firmasından temin edildi. Yapılan tüm deneylerde kullanılmak üzere 16,384 mg/mL L-askorbik asit, steril distile su içerisinde çözülüp 0,22 µm'lik steril membran filtreden (CLS431222, Sigma-Aldrich) geçirilip, stok solüsyonları hazırlandı. Deneylerde kullanılmak üzere, 1,024 mg/mL-0,000125mg/mL arasındaki çift kat dilue edilen askorbik asit konsantrasyonları hazırlandı.

3.5.3. Sanguinarine Klorür Hidrat (SAN) Hazırlanması

Saflık derecesi $\geq 98\%$ olan sanguinarine klorür hidrat (SAN) kimyasal bileşiği Sigma Aldrich (S5890-25MG) firmasından temin edildi (Sigma-Aldrich). Tüm deneyler için %10 Dimetil Sülfoksit (DMSO; Sigma-Aldrich) solüsyonu içinde, 1,28 mg/mL sanguinarine çözülüp stok olarak hazırlandı ve 0,22 µm'lik steril membran filtreden (CLS431222, Sigma-Aldrich) geçirildi. Gerekli olan sanguinarine konsantrasyonlarını elde etmek için, bakteri kültür süspansiyonlarına eklenmeden önce, DMSO'da hazırlanan ana stoktan deneylerde kullanılmak üzere, 0,128 mg/mL-0,000125 mg/mL arasındaki çift kat dilue edilen sanguinarine konsantrasyonları hazırlandı.

3.6. Sanguinarine ve Askorbik Asit MİK ve MBK'lerinin Belirlenmesi

Bakteri kolonileri %2 NaCl ve %1 glikoz eklenen MHB içerisine 0,5 McFarland (1.10^8 cfu/mL) yoğunlukta bakteri olacak şekilde inoküle edildi (Saginur et al., 2006; Stepanović et al., 2007).

Bu bakteri solüsyonları ilk test tüpünde 20 kat dilue (1/20) edilerek, son konsantrasyon 5.10^6 cfu/mL olacak şekilde hazırlandı. Askorbik asit (AA) ve sanguinarine (SAN) için hazırlanan ana stok solüsyonlarından 2 kat dilüsyon yapılarak sanguinarine için 11 doz, askorbik asit için 14 doz hazırlandı. Her kuyucuğa 180 µL sanguinarine ve bakterinin her kuyucuktaki son konsantrasyonu 5.10^5 cfu/mL olacak şekilde, 20 µL bakteri solüsyonu (5.10^6 cfu/mL) eklendi. Mikrotitre plaklar 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübasyon sonrasında mikrotitre plaklar, CLSI'ye göre bakteriyel büyümenin görsel olarak gözlenmediği en düşük bileşen konsantrasyonu, minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak belirlendi, ayrıca 50 µL örnek MHA besiyerine inoküle edilip, 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, üreme olmayan en düşük bileşen konsantrasyonu minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) olarak belirlendi (CLSI, 2013).

3.7. Sanguinarine ve Askorbik Asit Kombinasyonlarının Planktonik *S. aureus* İzolatları Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

3.7.1. Checkerboard Metot (Dama Tahtası Yöntemi)

96-kuyucuklu steril polistiren mikrotitre plaklarında, sanguinarine ve askorbik asitin kombine etkilerine Checkerboard metot (dama tahtası yöntemi) ile bakıldı.

Dama tahtası yönteminde kullanılan konsantrasyon aralıkları, her bir izolat için belirlenen MİK'lerine göre oluşturuldu ve çift kat dilüsyon yapılarak, bu MİK değerlerinin 16 kat alt ve 8 kat üst konsantrasyonları kullanıldı (Çizelge 3.4). Bakteri kolonileri, %2 NaCl ile %1 glikoz içeren MHB'a 0.5 McFarland (1.10^8 cfu/mL) yoğunlukta olacak şekilde inoküle edilerek bakteri solüsyonu hazırlandı (Saginur et al., 2006; Stepanović et al., 2007). Bakteri solüsyonları 20 kat (1/20) dilue edilerek bakteri yoğunluğu 5.10^6 cfu/mL'ye ayarlandı. Daha sonra bakteri yoğunluğu 5.10^5 cfu/mL olacak şekilde 20 µL (5.10^6 cfu/mL) bakteri solüsyonunu, 96-kuyucuklu

mikrotitre plağın her bir kuyucuğuna dağıtıldı. Her izolat için izelge 3.4'te verilen dozlar hazırlandı. Her sütuna 90 μL sanguinarine'in ve her satıra 90 μL askorbik asitin konsantrasyonları dağıtıldıktan sonra tüm kuyucuklara 20 μL ($5 \cdot 10^6$ cfu/mL) bakteri solüsyonu eklendi. Bakteri reme kontrolü için 180 μL steril distile su ve 20 μL bakteri solüsyonu eklendi. 37 $^\circ\text{C}$ de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan sonra her izolat için her satır ve sütunda bulunan kombinasyonların MİK'leri belirlendi. MİK'ler belirlendikten sonra, her kuyudan 50 μL rnek alınıp MHA besiyerine inokule edildi ve 37 $^\circ\text{C}$ de 24 saat inkübasyonda bekletildi. Inkübasyon sonunda, üremenin gözlenmediği en düşük konsantrasyon MİK, reme olmayan en düşük konsantrasyon MBK olarak belirlendi (CLSI, 2013). Tüm bu çalışmalar 2 biyolojik, 3 teknik tekrar olacak şekilde tekrar edildi.

Kombinasyon uygulamasında incelenen bileşenler arasındaki etkileşimi belirlemek için, çizilen dama tahtası tablosunda kullanılan her bileşen için FİK (fraksiyonel inhibitör konsantrasyon) indeksi hesaplandı. Bu hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır (Moody, 2004).

$$\text{FİK (A)} : \text{MİK A (B nin varlığında A (A + B))} / \text{MİK A (sadece A)}$$

$$\text{FİK (B)} : \text{MİK B (A nın varlığında B (A + B))} / \text{MİK B (sadece B)}$$

$$\Sigma\text{FİK} : \text{FİK (A)} + \text{FİK (B)}$$

Aşağıdaki kriterlere göre çıkan sonuçlar değerlendirildi.

$\Sigma\text{FİK} \leq 0,5$	Sinerji,
$0,5 < \Sigma\text{FİK} < 1$	Kısmi Sinerji
$\Sigma\text{FİK} = 1$	Aditif
$1 < \Sigma\text{FİK} \leq 4$	Indifferent (Etkisiz)
$\Sigma\text{FİK} > 4$	Antagonism

Çizelge 3.4. Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MİK ve MBK'lerinin belirlenmesi için kullanılan konsantrasyonlar.

Checkerboard Metotunda Uygulanan Konsantrasyonlar				
Bileşen	MSSA1	MSSA2	MSSA3	MSSA4
Askorbik Asit	2,048-0,016 mg/mL	0,256-0,002 mg/mL	1,024-0,008 mg/mL	1,024-0,008 mg/mL
Sanguinarine	0,032-0,00025 mg/mL	0,032-0,00025 mg/mL	0,064-0,0005 mg/mL	0,008-0,0000625 mg/mL

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon, MBK: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon.

Ayrıca, bileşenlerin alt-MİK'lerinin tek ve kombinasyon uygulamalarının, izolatların bakteriyel büyümesi üzerindeki etkilerinin gözlemlenebilmesi için, MHA'ya ekimleri yapıldı. 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra, bakteriyel koloniler sayılıp logaritmik birime çevirildi. Bu çalışma 2 biyolojik 3 teknik tekrar yapıldı. İzolatların büyüme oranları, tekrar edilen verilerin ortalama ve standart sapması hesaplanarak belirlendi.

3.8. Sanguinarine ve Askorbik Asitin *S. aureus* İzolatlarının Biyofilm Üretimi Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

3.8.1. Mikrotitre Plak Metodu (MtP)

96-kuyucuklu steril polistiren mikrotitre plaklarında sanguinarine ve askorbik asitin biyofilm üretimi üzerindeki kombine etkileri, Christensen Metod'dan uyarlanmış mikrotitre plak (MtP) yöntemi ile belirlendi. MtP yönteminde kullanılan konsantrasyon aralıkları her bir izolat için belirlenen MİK'lerine göre oluşturuldu (Çizelge 3.5). Çift kat dilüsyon yapılarak, bu MİK değerlerinin 1/16 kat alt ve 8 kat üst konsantrasyonları hazırlanıp, kullanıldı. Bakteri kolonileri, %2 NaCl ile %1 glikoz içeren MHB içerisine, 0.5 McFarland (1.10^8 cfu/mL) yoğunlukta olacak şekilde inokule edildi (Saginur et al., 2006; Stepanović et al., 2007).

Bakteri solüsyonları 20 kat (1/20) dilue edilerek bakteri yoğunluğu 5.10^6 cfu/mL'ye ayarlandı. Daha sonra her kuyucuktaki son bakteri yoğunluğu 5.10^5 cfu/mL olacak şekilde, 20 µL (5.10^6 cfu/mL) bakteri solüsyonu, 96-kuyucuklu mikrotitre plağın her bir kuyucuğuna dağıtıldı.

Her izolat için Çizelge 3.4'te verilen dozlar hazırlandı. Her sütuna 90 µL sanguinarine'in ve her satıra 90 µL askorbik asitin konsantrasyonları dağıtıldıktan sonra, tüm kuyucuklara 20 µL ($5 \cdot 10^6$ cfu/mL) bakteri solüsyonu eklendi. Bakteri üreme kontrolü için 180 µL steril distile su ve 20 µL bakteri solüsyonu eklendi. Blank için bir kuyuya 180 µL steril distile su ile 20 µL MHB eklendi. Daha sonra, 37 °C'de, 24 saat inkübasyonda bekletildi. 24 saat sonunda planktonik olan bakteriler aspire edildi. Planktonik bakteriler, kuyulardan aspire edildikten sonra kuyulara 150 µL metanol eklenerek, 20 dakika fiksasyon yapıldı. Ardından kuyular boşaltılarak, 150 µL safranin eklenerek, 15 dakika bekletildi. 15 dakika sonunda boşaltılan kuyular 2 kez fosfat buffer salin (PBS) (pH 7.2) ile yıkandı. Daha sonra mikrotitre plaklar oda ısısında kurutulduktan sonra 570 nm absorbansta mikrotitre plak okuyucuda spektrofotometrik olarak okutuldu. Bu çalışmalar 2 biyolojik, 3 teknik tekrar olacak şekilde tekrar edildi.

3.9. Sanguinarine ve Askorbik Asitin Olgun Biyofilm Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

3.9.1. MBEK Metodu

Sanguinarine ve askorbik asitin biyofilm üreten *S. aureus* izolatları üzerindeki kombine etkileri 96-kuyucuklu steril polistiren mikrotitre plaklarda MBEK metodu ile belirlendi. MBEK metodunda kullanılan konsantrasyon aralıkları her bir izolat için belirlenen MİK'lerine göre oluşturuldu ve çift kat dilüsyon yapılarak, bu MİK değerlerinin 1/16 kat alt konsantrasyonları Çizelge 3.5'e göre hazırlanıp, kullanıldı.

Bakteri kolonileri, %2 NaCl ile %1 glikoz içeren MHB besiyerine 0.5 McFarland ($1 \cdot 10^8$ cfu/mL) yoğunlukta olacak şekilde inokule edilip, bakteri solüsyonları hazırlandı (Saginur et al., 2006; Stepanović et al., 2007). Bakteri solüsyonları 200 kat (1/200) dilue edilerek $5 \cdot 10^5$ cfu/mL bakteri yoğunluğuna ayarlandı. Daha sonra 100 µL ($5 \cdot 10^5$ cfu/mL) bakteri solüsyonundan alınarak 96-kuyucuklu mikrotitre plaklara dağıtıldı. Bakteriler dağıtıldıktan sonra 48 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. 48 saat sonunda planktonik bakteriler aspire edilip, biyofilm oluşturan bakterilere, sanguinarine ve askorbik asitin 1/16 kat alt dozları uygulandı. Her bir kombinasyon kuyucuğuna 50 µL sanguinarine'in ve 50 µL askorbik asitin alt

inhibitör dozları eklendi. Bakteri üreme kontrol kuyucuğuna, herhangi bir bileşen uygulanmayıp, 100 µL MHB eklendi. Blank için 100 µL MHB eklendi. İlaç uygulaması yapıldıktan sonra, mikrotitre plaklar, 37 °C’de 24 saat inkübatörde bekletildi. 24 saat sonunda inkübatörden alınan mikrotitre plakların içeriği boşaltıldıktan sonra 2 kez PBS ile yıkandı. Yıkanan kuyulara 150 µL metanol eklenerek, yıkanan kuyular 20 dakika fiksasyona bırakıldı. Ardından kuyular boşaltılarak, 150 µL safranin eklenerek 15 dakika bekletildi. 15 dakika sonunda boşaltılan kuyular, 2 kez fosfat buffer salin (PBS) (pH 7.2) ile yıkandı. Mikrotitre plaklar oda ısısında kurutulduktan sonra, 570 nm absorbansta mikrotitre plak okuyucuda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tüm bu çalışmalar 2 biyolojik, 3 teknik tekrar olacak şekilde tekrar edildi. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre değerlendirildi (Wei et al., 2017) (Çizelge 3.5).

$$[1-(OD\ 570\ \text{ajan uygulanmış bakteri hücresi} / OD\ 570\ \text{ajansız kontrol})] \times 100$$

Çizelge 3.5. Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının, biyofilm üretimi ve olgun biyofilm üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyonlar.

Bileşenler		MSSA1	MSSA2	MSSA3	MSSA4
Sanguinarine	MİK	0,004	0,004	0,008	0,001
	1/2 MİK	0,002	0,002	0,004	0,0005
	1/4 MİK	0,001	0,001	0,002	0,00025
	1/8 MİK	0,0005	0,0005	0,001	0,000125
	1/16 MİK	0,00025	0,00025	0,0005	0,000625
Askorbik Asit	MİK	0,0256	0,032	0,128	0,0128
	1/2 MİK	0,128	0,016	0,064	0,064
	1/4 MİK	0,064	0,008	0,032	0,032
	1/8 MİK	0,032	0,004	0,016	0,016
	1/16 MİK	0,016	0,002	0,008	0,008

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon.

3.10. Sanguinarine ve Askorbik Asitin Biyofilm Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

3.10.1. Bakteriye İzolatlar ve Büyüme Koşulları

Bakteri solüsyonları, %2 NaCl ve %1 glikoz eklenen MHB içerisinde, 0.5 McFarland (1.10^8 cfu/mL) yoğunlukta bakteri olacak şekilde hazırlanıp, 37 °C de 24 saat inkübe edildi (Saginur et al., 2006; Stepanović et al., 2007). 24 saat sonunda, her bakteri solüsyonu 100 kat dilue edilerek, her uygulama için 6-kuyulu polistiren hücre doku kültürü plağının 2 kuyucuğuna (CLS3516, Sigma-Aldrich) 2'şer mL dağıtıldı. İzolatlar, 6-kuyulu polistiren hücre doku kültürü plaklarında, standart biyofilm oluşturmaları için inkübatörde 37 °C'de 48 saat bekletildi. İnkübasyondan sonra, kuyulardan planktonik bakteriler aspire edilip, biyofilm oluşturan izolatlar kuyularda bırakıldı.

Her izolat için belirlenen sanguinarine'in 1/4 MİK'i, askorbik asitin 1/4 MİK'i ve sanguinarine ile askorbik asit kombinasyonunun 1/4 MİK'i hazırlanıp, son hacim 2 mL olacak şekilde bakterilere uygulandı. Bakteri kontrollerine, 2 mL %2 NaCl ve %1 glikoz içeren MHB eklendi. Bileşen uygulaması yapıldıktan 12 saat sonra, kuyularda biyofilm oluşturan bakteriler, 10 kez steril soğuk distile su ile yıkanıp, pipet ucu yardımıyla kazınarak toplandı. Toplanan biyofilm oluşturan bakteriler, steril 15 mL'lik falkon tüplerine (LB.IS.078.02.007, ISOLAB) aktarılıp, 8000 g de 3 dakika santrifüj edildi ve supernatantı atılarak, pellet kısmı elde edildi (Atshan et al., 2012).

3.10.2. Total RNA Bakteri İzolasyonu

48 saat süresince biyofilm oluşturan ve sonrasında 12 saat bileşene tabi tutulan izolatlarda bileşen etkinliğinin oluşturduğu farklılıkları görmek amacıyla RNA izolasyonu gerçekleştirmek için dört farklı MSSA örneği (MSSA1, MSSA2, MSSA3, MSSA4) kullanıldı.

Kuyulardan kazınan bakteri pelletlerinden total RNA izolasyonu, NucleoSpin® RNA kiti protokollerine uygun olarak gerçekleştirildi.

Kit protokolünde belirtildiği üzere RNA izolasyonu öncesinde 20 µL lizozim (#Lot SLBM3565V, SIGMA) ve 80 µL TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH:8) karıştırılıp, kuyulardan kazınan bakteri pelletlerine eklenerek vortekslenip 15 dakika süresince 37°C inkübatörde bekletildi. 15 dakika sonra inkübatörden çıkarılan örnekler iyice vortekslenerek NucleoSpin® RNA kiti (740955.50, Macherey-Nagel) protokolüyle çalışmaya uygun hale getirildi.

NucleoSpin® RNA kiti protokollerine göre RNA izolasyonu için;

- RNA izolasyonunda kullanılan MSSA bakterileri peleti 350 µL lizis tamponu RA1 ve indirgeyici ajan olarak 3,5 µL 2- Merkaptoetanol karışımı içerisinde karıştırıldı.

- Bakteri lizati, bir toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş olan NucleoSpin® Filtrelerine aktarıldı. 11000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

- Santrifüj sonrası NucleoSpin® Filtreleri ortamdan uzaklaştırıldı. Lizatın homojenize edilmesi için tüm örnekler 350 µL %70 etanol eklendi. 3-5 kez pipetleme işleminden sonra her örnek kendisi için hazırlanan bir toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş NucleoSpin® RNA kolonuna aktarıldı. 11000 g'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra kolon yeni bir örnek toplama tüpüne yerleştirildi.

- NucleoSpin® RNA kolonuna 350 µL membran tuzu çözücü tampon (Membrane Desalting Buffer / MDB) eklendi. 11000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

- 10 µL rDNaz, 90 µl reaksiyon solüsyonu ile karıştırılarak DNaz reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışımdan 95 µl kolonun tam merkezine eklendi. 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

- Kolona 200 µL RAW2 tamponu eklendikten sonra 11000 g'de 30 saniye santrifüj edilerek 1. yıkama işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.

- Kolona 600 µL RA3 tamponu eklendikten sonra 11000 g'de 30 saniye santrifüj edilerek 2. yıkama işlemi gerçekleştirildi. Toplama tüpüne geçen kısım ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra kolon toplama tüpüne tekrar yerleştirildi.

- Kolonun tam merkezine 30 µL RNaz içermeyen su eklendikten sonra 11000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek RNA'nın kolondan ayrıştırılması

gerçekleştirildi. Bakteri peletinden izole edilen total RNA'nın saflığı ve konsantrasyon analizi, "Multiskan™ GO Microplate Spektrophotometer" cihazında 230, 260 ve 280 nm'de absorbans değerlerinin ölçümüyle gerçekleştirildi. Bulgular otomatik olarak hesaplanıp, kaydedildi. RNA'lar cDNA sentezinde kullanılmak üzere -80 °C buzdolabına kaldırıldı.

3.10.3. cDNA Sentezi

İzolasyonu yapılan total RNA'lardan cDNA sentezi ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit (E6300S, New England Biolabs) protokollerine uygun olarak gerçekleştirildi. Sentez işlemi BIORAD T100 Thermal Cycler cihazında yapıldı. Tüm cDNA konsantrasyonları 1 µg olacak şekilde sabitlendi. Bunun için kit protokolüne göre; 1µg cDNA için gerekli RNA miktarı (6 µL'ye kadar), 2 µL Oligo (dT) Primer ve son hacim 8 µL olacak şekilde nükleaz-içermeyen su ile bir reaksiyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımının 70 °C'de 5 dakika inkübe edilmesiyle RNA denatüre edildi. Denatürasyon işleminden sonra hemen buz üstüne alınan her örneğe 10 µL M-MuLV (2X) reaksiyon karışımı ve 2 µL M-MuLV enzim karışımı eklendi. 20 µL cDNA sentez kiti 42 °C'de 1 saat inkübe edildi ve ardından enzimin inaktivasyonu için 80 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Elde edilen cDNA'lar 30 µL RNaz içermeyen su eklenerek, 50 µL'ye tamamlandı.

3.10.4. Kantitatif GZ-PZR Reaksiyonu

Biyofilm oluşturan izolatlar 1/4 MİK sanguinarine ile 1/4 MİK askorbik asit ve bu ikisinin kombinasyonu uygulandı. Kontrol izolatlarına herhangi bir bileşen uygulanmadı. İzolatların 12 saat süresince bileşenlere maruz kalması sonucunda elde edilen cDNA'lar ile *ica* genlerinden *icaA*, *icaD* ve yüzey proteini geni olan *atl* genlerinin ekspresyon seviyeleri incelendi. Analiz SensiFAST™ SYBR®No-ROX Kit protokollerine uygun olarak Çizelge 3.6'da belirtilen GZ-PZR reaktifleri ile Çizelge 3.7'de belirtilen GZ-PZR koşullarında gerçekleştirildi.

Çizelge 3.6. GZ-PZR reaktifleri

Reaktif	Stok Konsantrasyon	Hacim (μ L)
SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit	2X	10
İleri Primer	10 μ M	1
Geri Primer	10 μ M	1
DNA	8 ng/ μ L	2
Su	-	6

Çizelge 3.7. GZ-PZR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Polimeraz Enzim Aktivasyonu	95 °C	5 dk	
Denatürasyon	95 °C	10 sn	
Bağlanma	60 °C	10 sn	45
Uzama	72 °C	30 sn	
Erime Analizi	Eğrisi 65°C -95 °C	5 sn	

GZ-PZR reaksiyonları iki teknik tekrar ile gerçekleştirildi. Elde edilen grafik sonuçları, *16S-rRNA* internal kontrol genine göre normalize edilerek, sonuçların delta siklus eşiği (Δ Ct) değerleri belirlendi. Elde edilen Δ Ct değerleri kullanılarak $\Delta\Delta$ Ct değerleri hesaplandı. $\Delta\Delta$ Ct değerlerinin elde edilmesinin ardından $2^{-\Delta\Delta$ Ct formülü ile gen ekspresyon düzeyindeki değişim hesaplandı (Livak and Schmittgen, 2001).

3.11. Verilerin Analizi

MtP, checkerboard, MBEK, biyofilm üretimi deneylerinden elde edilen veriler, ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanarak değerlendirildi. Çalışmadaki tüm deneyler, 2 biyolojik ve 3 teknik tekrar olacak şekilde uygulandı. Verilerin istatistiğinde IBM SPSS Statistic 21 programı kullanıldı. Gruplar arasında (kontrol ve

dozlar) anlam olup olmadığı Friedman testi ile belirlendi. İstatistiksel olarak anlamlı çıkanlarda hangi gruplar arasında anlam olduğuna Paired Sample t-Test analizi ile bakıldı. P değeri 0,05'e eşit ve altında olan veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gen ekspresyon çalışmalarında ilgili genlerin 1,5 ve üstü kat değerleri ciddi bir artış olarak değerlendirilirken 1'den büyük, 1,5'ten küçük değerler ciddi olmayan kısmi bir azalma olarak değerlendirildi. 1'den küçük değerler ciddi bir azalma olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Bakterilerin Tanımlanması

Kendi stoğumuzda bulunan bakteri örnekleri BD Phoenix bakteri identifikasyon cihazı ile tanımlandı. Metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) olduğu tespit edilen 3 bakteri örneği ile çalışmalara devam edildi. MSSA1 (ATCC 29213 MSSA) kontrol suşu olarak kullanıldı. Çalışmada MSSA2, MSSA3, MSSA4 olmak üzere 3 klinik izolat kullanıldı.

4.2. *S. aureus* Bakterilerinde Kalitatif Gen Tespiti

Yöntem 3.3.2’de belirtildiği şekilde izole edilen *S. aureus* klinik izolatlarının DNA’ları Çizelge 3.1’de belirtilen genlerin varlığı kalitatif olarak gerçek zamanlı PZR yöntemiyle tespit edildi. Tespit edilen genlerin sonuçları aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 4.1).

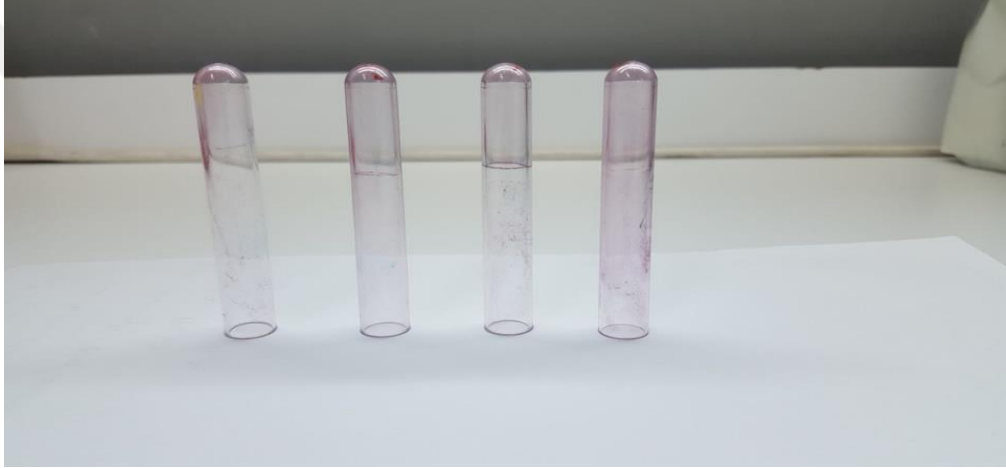
Çizelge 4.1. Gerçek zamanlı PZR çalışması yapılan ve kalitatif olarak tespit edilen genler ve sonuçları.

Genler	MSSA1	MSSA2	MSSA3	MSSA4
<i>16S rRNA</i>	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
<i>nuc</i>	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
<i>blaZ</i>	Tespit edildi	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
<i>blaI</i>	Tespit edildi	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
<i>blaR1</i>	Tespit edildi	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
<i>icaA</i>	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
<i>icaD</i>	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
<i>atl</i>	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
<i>mecA</i>	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi

4.3. Biyofilm İdentifikasyonu

4.3.1. Tüp Metot Sonucu

Yöntem 3.4.1’de uygulanan tüp metodu deney sonuçları Şekil 4.1’de verilmiştir. Tüp metot yöntemi uygulanan örneklerde 1., 2., 3., 4. polistiren tüplerde biyofilm halkası görülmektedir. Birinci ve dördüncü tüpler MSSA3, MSSA4 izolatlarına ait. İkinci ve üçüncü tüpler ise MSSA1, MSSA2 tüplerine aittir.



Şekil 4.1. Tüp metodu şekli.

4.3.2. Mikrotitre Plak Metodu (MtP) Sonucu

Yöntem 3.4.2’de anlatılan mikrotitre plak yönteminde MSSA1 (ATCC 29213) suşunda ve MSSA2, MSSA3, MSSA4 izolatlarında biyofilm oluşturulduktan sonra safraninle boyama işleminden sonra spektrofotometre mikrotitre plak okuyucu ile 570 nm absorbansta ölçüm yapıldı. Bu sonuçlar yöntem 3.4.2’de verilen hesaplamalar sonucunda değerlendirildi. MSSA1 şusunun güçlü biyofilm oluşturduğu gözlemlendi. MSSA2 izolatının güçlü biyofilm oluşturduğu gözlemlendi. MSSA3 izolatının orta derecede biyofilm oluşturduğu gözlemlendi. MSSA4 izolatının orta derecede biyofilm oluşturduğu gözlemlendi.

4.4. Sanguinarine ve Askorbik Asitin MİK ve MBK Sonuç Değerlendirilmesi

Yöntem 3.6'da uygulanan "Sanguinarine ve Askorbik Asitin MİK ve MBK'lerinin belirlenmesi" deneyinde çıkan sonuçlar Çizelge 4.2 de verilmiştir. Sanguinarine ve askorbik asit uygulanan MSSA izolatlarında MİK değerleri sırasıyla 0,001-0,008 mg/mL ve 0,032 mg/mL-0,256 mg/mL arasında tespit edilmiştir. Ayrıca sanguinarine ve askorbik asit uygulanan MSSA izolatlarında MBK değerleri sırasıyla 0,002-0,032 mg/mL ve 0,064-0,512 mg/mL arasında tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Planktonik *S. aureus* izolatlarında belirlenen MİK ve MBK değerleri.

Bakteri İzolatları	Antimikrobiyal Ajan	MİK (mg/mL)	MBK (mg/mL)
MSSA1	SAN	0,004	0,016
	AA	0,256	0,064
MSSA2	SAN	0,004	0,016
	AA	0,032	0,128
MSSA3	SAN	0,008	0,032
	AA	0,128	0,128
MSSA4	SAN	0,001	0,002
	AA	0,128	0,512

AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

4.5. Sanguinarine ile Askorbik Asit Kombinasyonlarının Planktonik *Staphylococcus aureus* İzolatları Üzerindeki Etkisi

4.5.1. MSSA1

Sanguinarine ve askorbik asitin alt MİK'lerini içeren çeşitli uygulamalarının, MBK'sı bu bileşenlerin tek uygulamalarının MBK'lerine göre daha düşük (daha etkili) olduğundan, MSSA izolatlarını öldürmek için yeterli olduğu görüldü. Bu çalışmada MSSA izolatlarının FİK indeksleri 0,699 ile 0,920 aralığında tespit edilmiştir (Çizelge

4.3). Her izolat için bileşenlerin tekli ve kombinasyon uygulamalarında, her tekrarda MİK ve MBK sonuçları aynı gözlemlendi.

Çizelge 4.3. Sanguinarine ile Askorbik Asit kombinasyonlarının *S. aureus* izolatları üzerindeki etkisi.

Bakteri	Kombinasyon	FİK Değer	Etki
MSSA1	SAN-AA	$0.5 < \Sigma FİK < 1$ (0,745)	Kısmi Sinerji
MSSA2	SAN-AA	$0.5 < \Sigma FİK < 1$ (0,745)	Kısmi Sinerji
MSSA3	SAN-AA	$0.5 < \Sigma FİK < 1$ (0,920)	Kısmi Sinerji
MSSA4	SAN-AA	$0.5 < \Sigma FİK < 1$ (0,699)	Kısmi Sinerji

AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, FİK: Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu.

Bu çalışmada, MSSA1 suşu üzerinde sanguinarine ve askorbik asit kombinasyonlarının FİK indeks değeri 0,745 ile kısmi sinerjistik etkisinin olduğu belirlendi (Çizelge 4.4). Sırasıyla, sanguinarine'in 0,002 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,0005 mg/mL, 0,00025 mg/mL (1/2 MİK, 1/4 MİK, 1/8 MİK, 1/16 MİK) alt-inhibitör konsantrasyonları ile 0,128 mg/mL, 0,064 mg/mL, 0,032 mg/mL, 0,016 mg/mL (1/2 MİK, 1/4 MİK, 1/8 MİK, 1/16 MİK) askorbik asitin alt-inhibitör konsantrasyonları arasında kısmi sinerjistik aktivite görülmüştür.

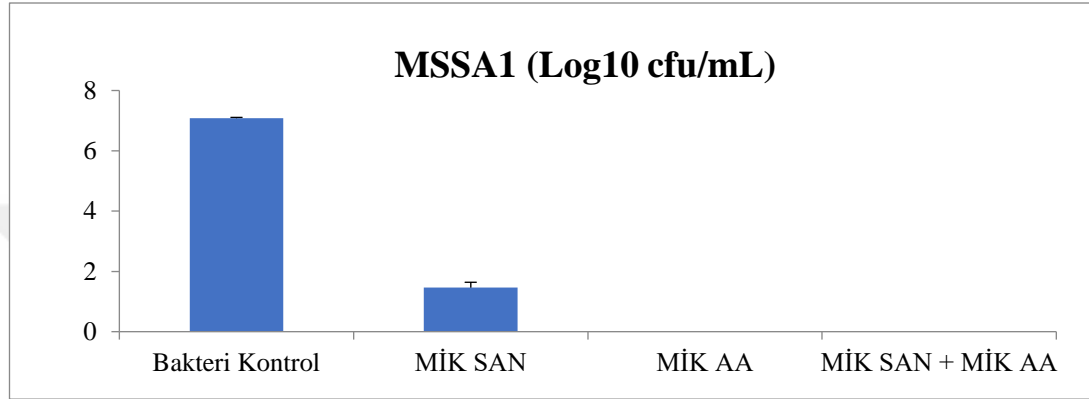
Çizelge 4.4. Askorbik Asit ile Sanguinarine kombinasyonlarının MSSA izolatları üzerindeki FİK İndeksleri.

			MSSA1	MSSA2	MSSA3	MSSA4
$\Sigma FİK$ indeks	SAN-AA	ORTALAMA \pm SD	0,745 \pm 0,25	0,745 \pm 0,21	0,920 \pm 0,65	0,699 \pm 0,24

AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, SD: Standart Sapma (Standard deviation).

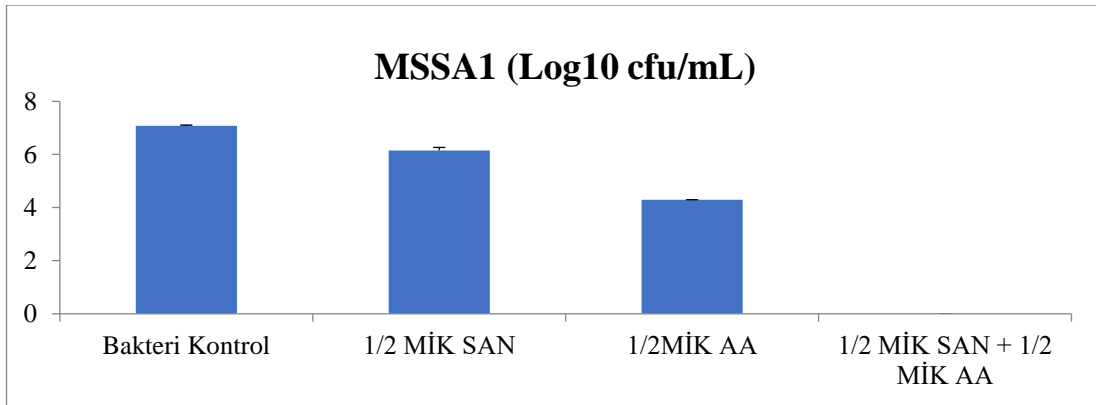
MSSA1 suşu üzerindeki, sanguinarine ve askorbik asitin tek ve kombinasyon uygulamalarında, 0,004 mg/mL sanguinarine'in (MİK SAN) tek uygulamasında kontrole göre 5,624 log sıklus düşüş gözlenmiştir ($p < 0,05$). 0,256 mg/mL askorbik asitin (MİK AA) tek uygulaması MSSA1 suşunu tamamen öldürüp, bakterisidal etki

göstermiştir. 0,004 mg/mL sanguinarine ile 0,256 mg/mL askorbik asitin (MİK SAN ve MİK AA) kombinasyon uygulaması, MSSA1 suşunu tamamen öldürüp, bakterisidal etki göstermiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.5) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA1 suşunun (ATCC 29213) büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

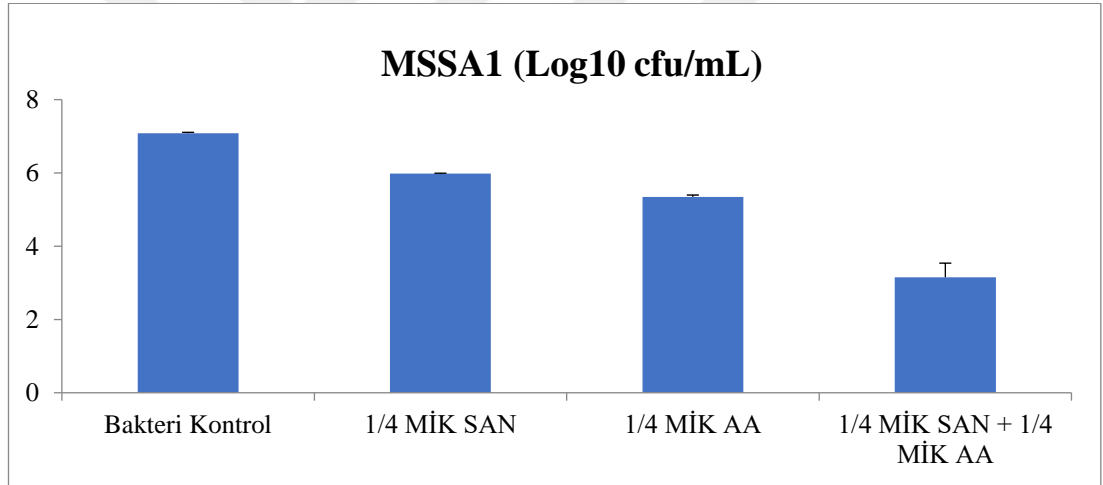
0,002 mg/mL sanguinarine’in (1/2 MİK SAN) tek uygulaması, kontrole göre MSSA1 suşunda 0,928 log siklüs düşüş göstermiştir ($p>0,05$). 0,128 mg/mL askorbik asitin (1/2 MİK AA) tek uygulamasında ise kontrole göre, MSSA1 suşunda, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 2,789 log siklüs düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$). 0,002 mg/mL sanguinarine’in ile 0,128 mg/mL askorbik asitin (1/2 MİK SAN ve 1/2 MİK AA) kombinasyon uygulaması MSSA1 suşunu tamamen öldürüp, bakterisidal etki göstermiştir (Çizelge 4.5) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. 1/2 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA1 suşunun (ATCC 29213) büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

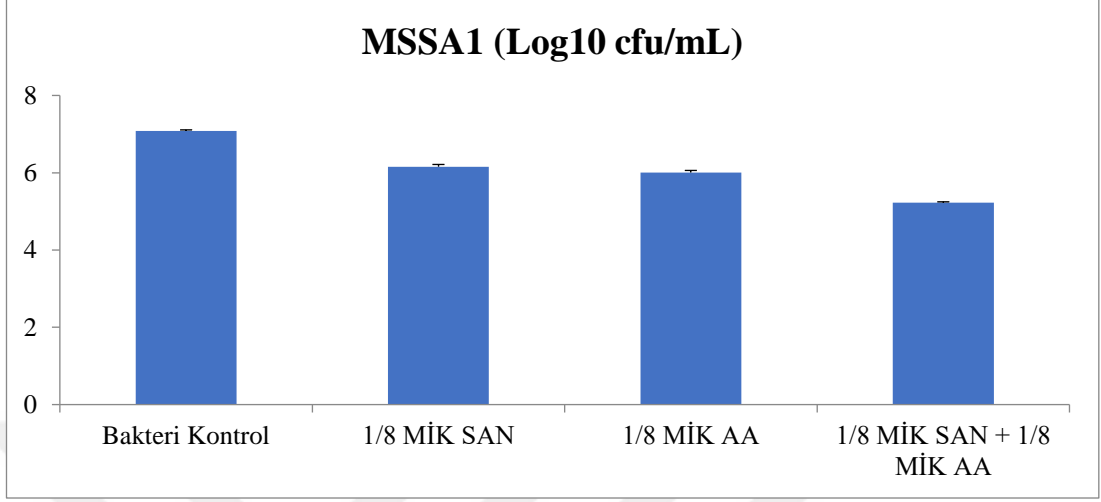
MSSA1 suşu üzerindeki, 0,001 mg/mL sanguinarine'in (1/4 MİK SAN) ve 0,064 mg/mL askorbik asitin (1/4 MİK AA) tek uygulamalarının etkinlikleri, istatistiksel olarak aynı olup ($p>0,05$), kontrole göre sırasıyla 1,102 ve 1,737 log sıklüs düşürmüştür ($p<0,05$).

0,001 mg/mL sanguinarine ile 0,064 mg/mL askorbik asitin (1/4 MİK SAN ve 1/4 MİK AA) kombinasyon etkisi, bu kombinasyonu oluşturan bileşenlerin tek uygulamalarının etkisinden daha fazla olup, bu kombinasyon, en etkin tek doz uygulaması olan 0,064 mg/mL askorbik asite göre MSSA1 suşunu 2,194 log sıklüs düşürmüştür ($p<0,005$) (Çizelge 4.5) (Şekil 4.4).



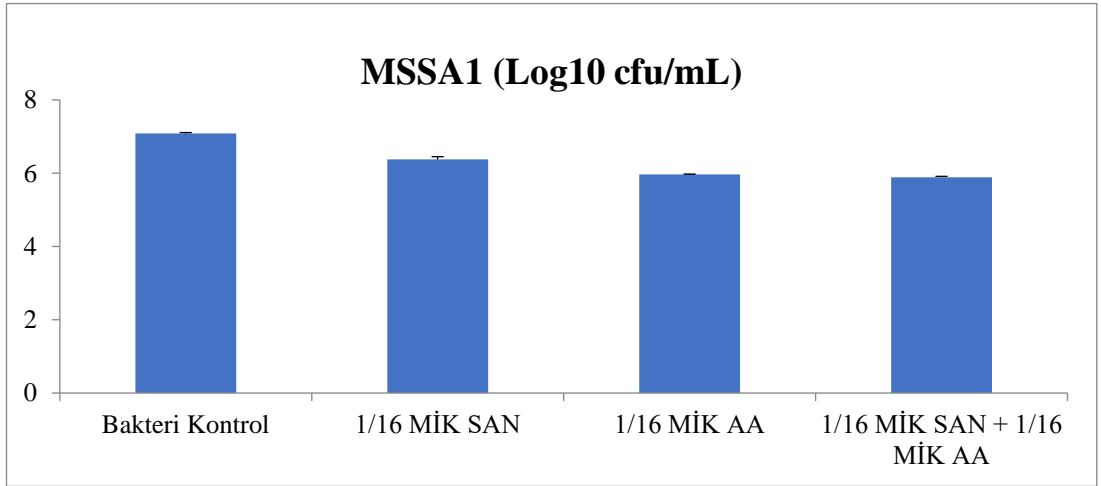
Şekil 4.4. 1/4 MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA1 suşunun (ATCC 29213) büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

MSSA1 suşu üzerindeki, 0,0005 mg/mL sanguinarine'in (1/8 MİK SAN) ve 0,032 mg/mL askorbik asitin (1/8 MİK AA) tek uygulamalarının etkinlikleri istatistiksel olarak aynı olup ($p>0,05$), kontrole göre, yaklaşık olarak 1 log sıklüs düşürmüştür. 0,0005 mg/mL sanguinarine ile 0,032 mg/mL askorbik asitin (1/8 MİK SAN ve 1/8 MİK AA) kombinasyon etkisi, bu kombinasyonu oluşturan bileşenlerin tek uygulamalarının etkisinden daha fazla olup, bu kombinasyon tek uygulamalara göre MSSA1 suşunu, yaklaşık olarak 1 log sıklüs, kontrole göre ise yaklaşık 1,86 log sıklüs düşürmüştür ($p<0,05$) (Çizelge 4.5) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. 1/8 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA1 suşunun (ATCC 29213) büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

0,00025 mg/mL sanguinarine ve 0,016 mg/mL askorbik asit 1/16 MİK tek uygulamaları ve bu bileşenlerin 1/16 MİK’lerindeki kombinasyonlarının uygulamaları sonucunda MSSA1 suşu üzerinde anlamlı bir antibakteriyel etkinliğinin olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0,05$) (Çizelge 4.5) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. 1/16 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA1 suşunun (ATCC 29213) büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

Çizelge 4.5. MSSA1 suşu üzerindeki Sanguinarine ve Askorbik Asit kombinasyonlarının etkisi.

	Sanguinarine ve Askorbik Asit Tek ve Kombinasyon Uygulamaları	Log Siklüs (cfu/mL) Ort±SD	P
MSSA 1	Bakteri Kontrol	7,084 ^a ±0,201	
MİK	MİK SAN (0,004 mg/mL)	1,460 ^b ±0,156	p=0,029*
	MİK AA (0,256 mg/mL)	Tespit Edilemedi	
	MİK SAN+MİK AA	Tespit Edilemedi	
1/2 MİK	1/2 MİK SAN (0,002 mg/mL)	6,156 ^a ±0,441	p=0,029*
	1/2 MİK AA (0,128 mg/mL)	4,295 ^b ±0,012	
	1/2 MİK SAN+ 1/2 MİK AA	Tespit Edilemedi	
1/4 MİK	1/4 MİK SAN (0,001 mg/mL)	5,981 ^b ±0,105	p=0,029*
	1/4 MİK AA (0,064 mg/mL)	5,347 ^b ±0,494	
	1/4 MİK SAN+1/4 MİK AA	3,153 ^c ±0,120	
1/8 MİK	1/8 MİK SAN (0,0005 mg/mL)	6,157 ^{ab} ±0,336	p=0,042*
	1/8 MİK AA (0,032 mg/mL)	6,006 ^b ±0,312	
	1/8 MİK SAN+1/8 MİK AA	5,226 ^c ±0,051	
1/16 MİK	1/16 MİK SAN (0,00025 mg/mL)	6,376 ^a ±0,128	p=0,122
	1/16 MİK AA (0,016 mg/mL)	5,966 ^a ±0,097	
	1/16 MİK SAN+1/16 MİK AA	5,890 ^a ±0,156	

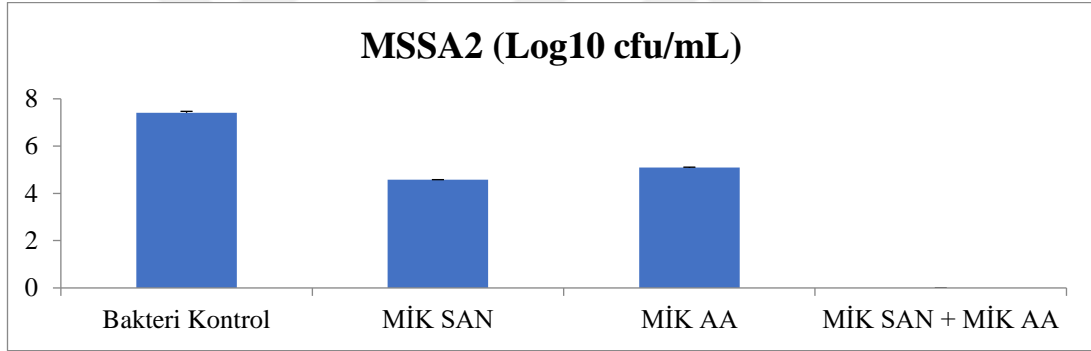
Her farklı harf, gruplar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir (*p<0,05). AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma (Standard deviation).

4.5.2. MSSA2

MSSA2 izolatu üzerinde sanguinarine ve askorbik asit kombinasyonlarının, 0,745 FİK indeksiyle kısmi sinerjistik etki gösterdiği belirlendi (Çizelge 4.4). Sırasıyla, 0,002 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,0005 mg/mL, 0,00025 mg/mL (1/2 MİK, 1/4 MİK, 1/8 MİK, 1/16 MİK) sanguinarine'in alt-inhibitör konsantrasyonları ile 0,016 mg/mL, 0,008 mg/mL 0,004 mg/mL, 0,002 mg/mL (1/2 MİK, 1/4 MİK, 1/8 MİK, 1/16

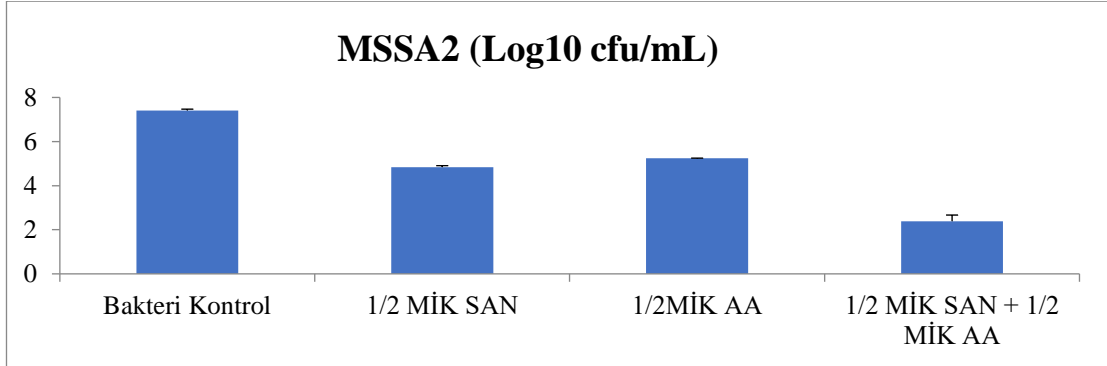
MİK) askorbik asitin alt-inhibitör konsantrasyonları arasında kısmi sinerjistik aktivite olduğu görülmüştür. Uygulanan her tekrardan sonra aynı sonuçlar elde edilmiştir. MSSA2 izolatının sanguinarine ile askorbik asit alt inhibisyon konsantrasyonlarının tek uygulamalarına göre etkinliğinin daha fazla olduğu görülmüştür.

MSSA2 klinik izolatı üzerinde, 0,004 mg/mL sanguinarine'in (MİK SAN) tek uygulamasında, kontrol uygulamasına göre 2,828 log birim düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$). 0,032 mg/mL askorbik asit (MİK AA) tek uygulamasında kontrol uygulamasına göre 2,311 log düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$). 0,004 mg/mL sanguinarine ile 0,032 mg/mL askorbik asitin (MİK SAN ve MİK AA) kombinasyon uygulaması, MSSA2 izolatını tamamen öldürüp, bakterisidal etki göstermiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.6) (Şekil 4.7).



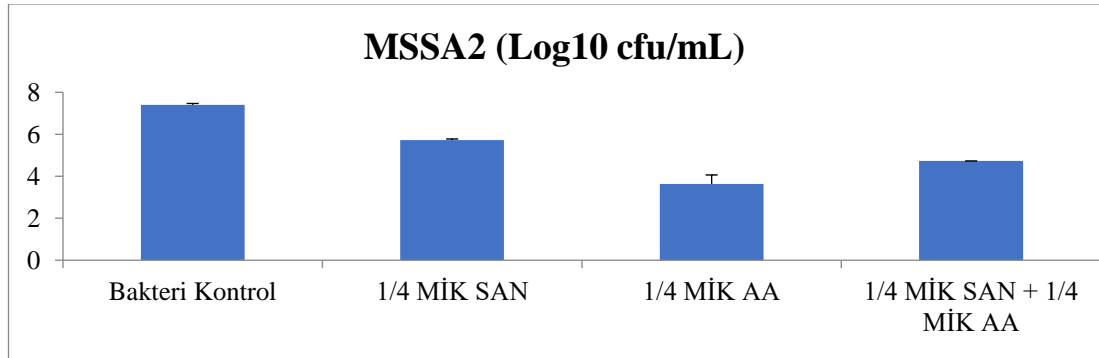
Şekil 4.7. MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA2 izolatının büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

MSSA2 izolatında, 0,002 mg/mL sanguinarine'in (1/2 MİK SAN) tek uygulaması, kontrole göre 2,564 log siklus düşüş göstermiştir ($p>0,05$). 0,016 mg/mL askorbik asitin (1/2 MİK AA) tek uygulamasında ise kontrole göre istatistiksel olarak, anlamlı bir şekilde 2,166 log siklus düşüş göstermiştir ($p<0,05$). 0,002 mg/mL sanguinarine ile 0,016 mg/mL askorbik asitin (1/2 MİK SAN ve 1/2 MİK AA) kombinasyon etkisi, bu kombinasyonu oluşturan bileşenlerin tek uygulamalarının etkinliğinden daha fazla olup, bu kombinasyon tek uygulamalara göre MSSA2 izolatını yaklaşık 2 log siklus, kontrole göre yaklaşık 5 log siklus düşürmüştür ($p<0,05$) (Çizelge 4.6) (Şekil 4.8).



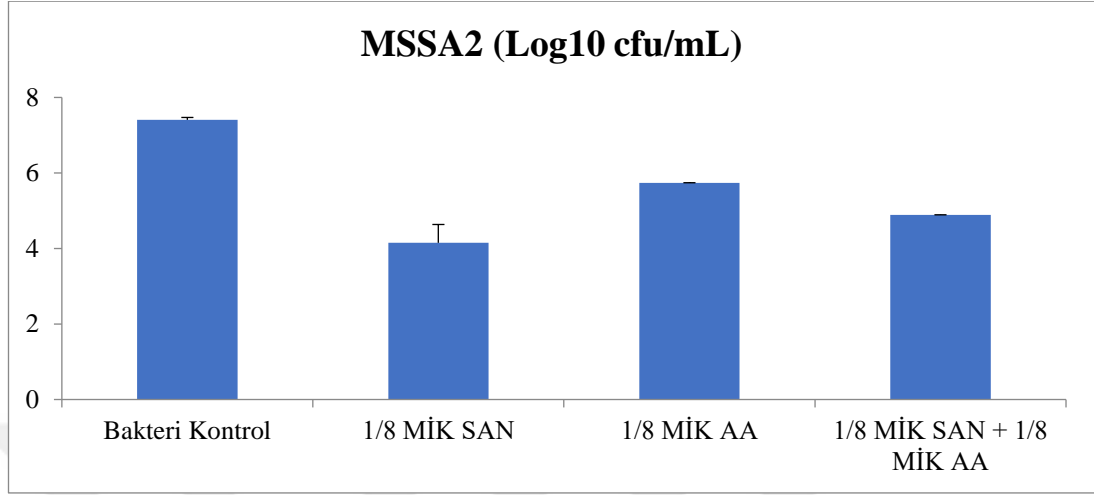
Şekil 4.8. 1/2 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA2 izolatının büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

MSSA 2 izolatında, 0,001 mg/mL sanguinarine’ in (1/4 MİK SAN) ve 0,008 mg/mL askorbik asitin (1/4 MİK AA) tek uygulamalarının etkinlikleri istatistiksel olarak aynı olup ($p>0,05$), kontrole göre sırasıyla, 1,676 ve 3,77 log siklus düşürmüştür ($p<0,05$). 0,001 mg/mL sanguinarine ile 0,008 mg/mL askorbik asitin (1/4 MİK SAN ve 1/4 MİK AA) kombinasyon etkisi kontrole göre 2,68 log düşüş göstermiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.6) (Şekil 4.9).



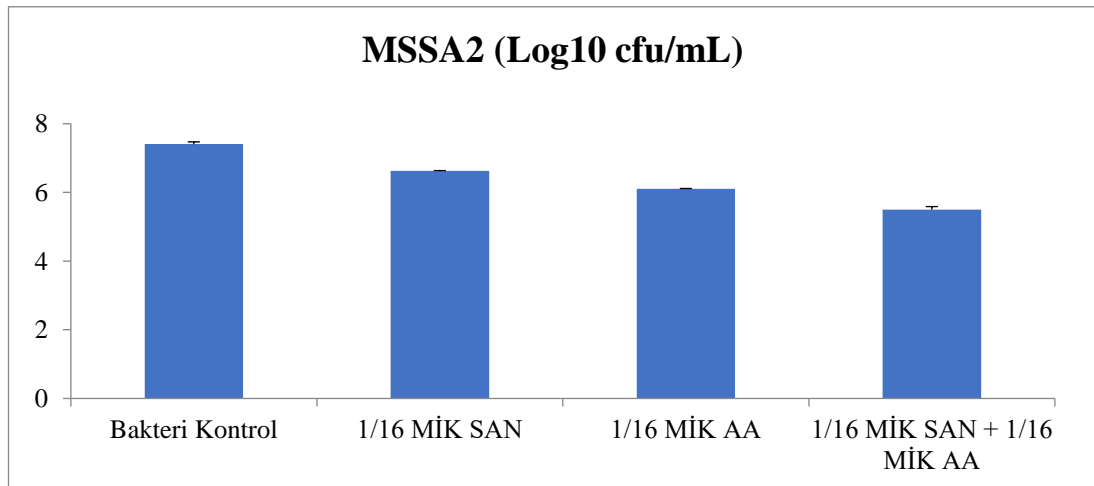
Şekil 4.9. 1/4 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA2 izolatının büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

MSSA2 izolatında, 0,0005 mg/mL sanguinarine (1/8 MİK SAN) tek uygulaması, kontrole göre MSSA2 izolatında 3,257 log siklus düşüş göstermiştir ($p>0,05$). 0,004 mg/mL askorbik asitin (1/8 MİK AA) tek uygulamasında ise kontrole göre, istatistiksel olarak, anlamlı bir şekilde 1,672 log siklus düşüş göstermiştir ($p<0,05$). 0,0005 mg/mL sanguinarine ile 0,004 mg/mL askorbik asitin (1/8 MİK SAN ve 1/8 MİK AA) kombinasyon uygulaması kontrole göre 2,517 log siklus düşüş göstermiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.6) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. 1/8 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA2 izolatının büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

MSSA2 izolatında, 0,00025 mg/mL sanguinarine’in (1/16 MİK SAN) ve 0,002 mg/mL askorbik asitin (1/16 MİK AA) tek uygulamaları ve bu bileşenlerin (1/16 MİK SAN ve 1/16 MİK AA) kombinasyon uygulamasında MSSA2 izolatı üzerinde anlamlı bir antibakteriyel etkinliğin olmadığı gözlemlenmiştir ($p < 0,05$) (Çizelge 4.6) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. 1/16 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA2 izolatının büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit. SAN: Sanguinarine.

Çizelge 4.6. MSSA2 izolatu üzerindeki Sanguinarine ve Askorbik Asit kombinasyonlarının etkisi.

	Sanguinarine ve Askorbik Asit Tek ve Kombinasyon Uygulamaları	Log Siklüs (cfu/mL) Ort±SD	P
MSSA 2	Bakteri Kontrol	7,407 ^a ±0,472	
MİK	MİK SAN (0,004 mg/mL)	4,579 ^b ±0,022	p=0,029*
	MİK AA (0,032 mg/mL)	5,096 ^c ±0,104	
	MİK SAN+MİK AA	Tespit Edilemedi ^d	
1/2 MİK	1/2 MİK SAN (0,002 mg/mL)	4,843 ^b ±0,469	p=0,029*
	1/2 MİK AA (0,016 mg/mL)	5,241 ^b ±0,062	
	1/2 MİK SAN+ 1/2 MİK AA	2,389 ^c ±0,056	
1/4 MİK	1/4 MİK SAN (0,001 mg/mL)	5,731 ^b ±0,343	p=0,042*
	1/4 MİK AA (0,008 mg/mL)	3,637 ^b ±0,107	
	1/4 MİK SAN+1/4 MİK AA	4,727 ^c ±0,018	
1/8 MİK	1/8 MİK SAN (0,0005 mg/mL)	4,150 ^b ±0,007	p=0,029*
	1/8 MİK AA (0,004 mg/mL)	5,735 ^c ±0,048	
	1/8 MİK SAN+1/8 MİK AA	4,890 ^d ±0,008	
1/16 MİK	1/16 MİK SAN (0,00025 mg/mL)	6,631 ^{ab} ±0,037	p=0,029*
	1/16 MİK AA (0,002 mg/mL)	6,109 ^{cd} ±0,040	
	1/16 MİK SAN+1/16 MİK AA	5,500 ^{bd} ±0,644	

Her farklı harf, gruplar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir (*p<0,05). AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma (Standard deviation).

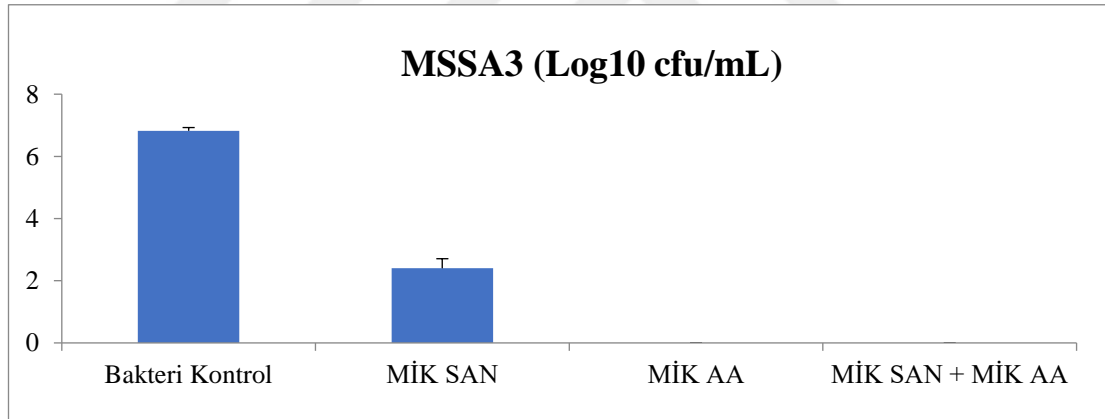
4.5.3. MSSA3

MSSA3 izolatu üzerinde sanguinarine ve askorbik asit kombinasyonlarının 0,920 FİK indeksiyle kısmi sinerjistik etki gösterdiği belirlendi (Çizelge 4.4). Sırasıyla, 0,004 mg/mL, 0,002 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,0005 mg/mL (1/2 MİK, 1/4 MİK, 1/8 MİK, 1/16 MİK) sanguinarine'in alt-inhibitör konsantrasyonları ile 0,064 mg/mL, 0,032 mg/mL, 0,016 mg/mL, 0,008 mg/mL (1/2 MİK, 1/4 MİK, 1/8 MİK, 1/16

MİK) askorbik asitin alt-inhibitör konsantrasyonları arasında kısmi sinerjistik aktivite görülmüştür. Uygulanan her tekrardan sonra aynı sonuçlar elde edilmiştir. MSSA 3 izolatının askorbik asit ile sanguinarine alt inhibisyon konsantrasyonlarının tek uygulamalarına göre etkinliğinin daha fazla olduğu görülmüştür.

MSSA3 klinik izolatında antibakteriyel ajanların tek ve kombinasyon uygulamaları sonucunda 0,008 mg/mL sanguinarine'in (MİK SAN) tek uygulamasında kontrole göre 3,22 log siklüs düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$). 0,128 mg/mL askorbik asitin (MİK AA) tek uygulaması ise tamamen öldürüp, bakterisidal etki göstermiştir ($p<0,05$).

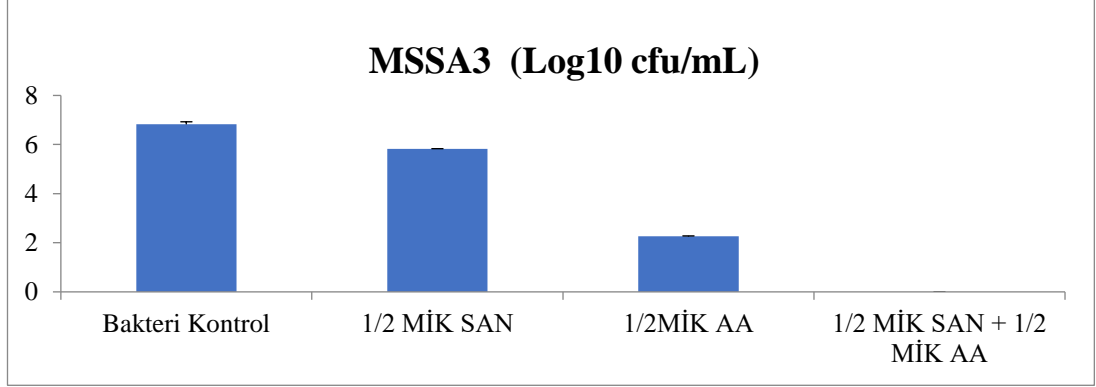
0,008 mg/mL sanguinarine ile 0,128 mg/mL askorbik asitin (MİK SAN + MİK AA) kombinasyon uygulaması ise tamamen öldürüp, bakterisidal etki göstermiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.7) (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA3 izolatının büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit. SAN: Sanguinarine.

MSSA3 izolatında 0,004 mg/mL sanguinarine'in (1/2 MİK SAN) tek uygulaması, kontrole göre 1 log siklüs düşüş göstermiştir ($p>0,05$).

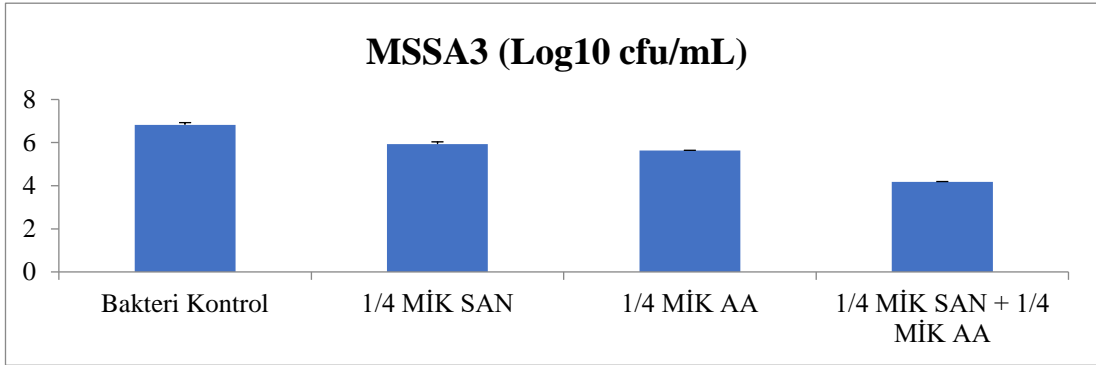
0,064 mg/mL askorbik asitin (1/2 MİK AA) tek uygulaması kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 4,557 log siklüs düşüş göstermiştir ($p<0,05$). 0,004 mg/mL sanguinarine ile 0,064 mg/mL askorbik asitin (1/2 MİK SAN ve 1/2 MİK AA) kombinasyon uygulaması MSSA3 izolatını tamamen öldürüp, bakterisidal etki göstermiştir (Çizelge 4.7) (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. 1/2 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA3 izolatının büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

MSSA3 izolatında 0,002 mg/mL sanguinarine’in (1/4 MİK SAN) tek uygulaması kontrole göre 0,891 log siklüs düşüş göstermiştir ($p < 0,05$). 0,032 mg/mL askorbik asitin (1/4 MİK AA) tek uygulamasında ise anlamlı olmayan 1,197 log siklüs düşüş gözlemlenmiştir ($p > 0,05$).

0,002 mg/mL sanguinarine ile 0,032 mg/mL askorbik asitin (1/4 MİK SAN ve 1/4 MİK AA) kombinasyon uygulamasında kontrole göre 2,646 log siklüs düşüş gözlemlenmiştir ($p < 0,05$) (Çizelge 4.7) (Şekil 4.14).

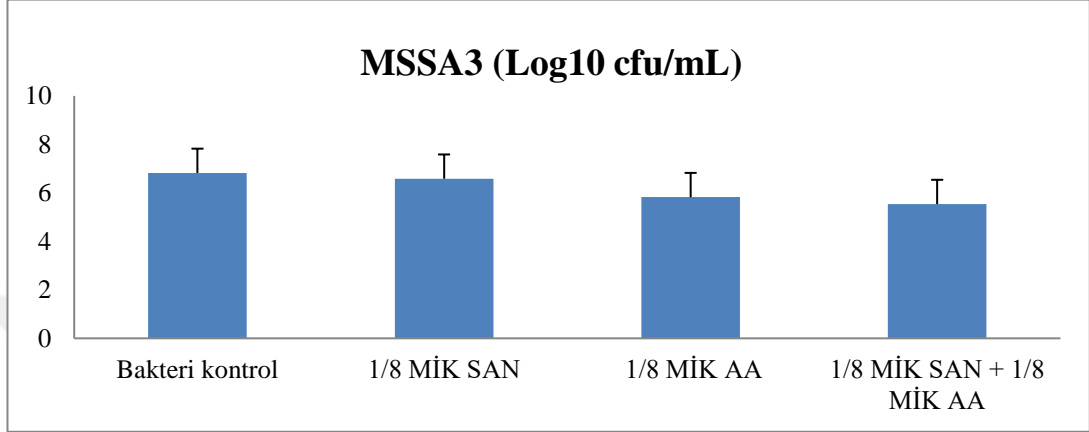


Şekil 4.14. 1/4 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA3 izolatının büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

MSSA3 izolatında, 0,001 mg/mL sanguinarine (1/8 MİK SAN) tek uygulaması kontrole göre 0,239 log siklüs düşüş göstermiştir ($p > 0,05$).

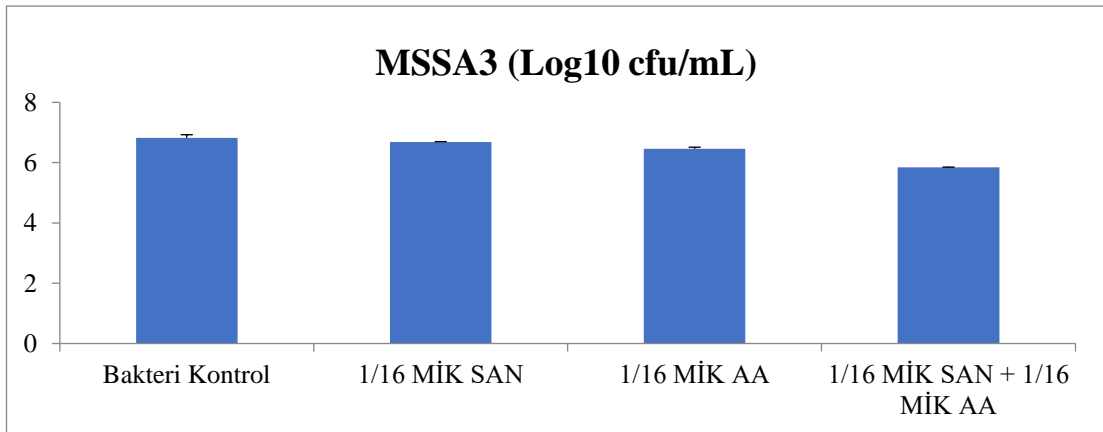
Tek 0,016 mg/mL askorbik asit (1/8 MİK AA) ise MSSA3 izolatını anlamlı olmayan bir şekilde 0,999 log siklüs düşürmüştür ($p > 0,05$). 0,001 mg/mL sanguinarine ile 0,016 mg/mL askorbik asitin (1/8 MİK SAN ve 1/8 MİK AA) kombinasyon uygulamasında,

MSSA3 izolatu üzerinde kontrole göre 1,284 log sıklus düşüş gözlemlenmiştir ($p < 0,05$) (Çizelge 4.7) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. 1/8 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA3 izolatının büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

MSSA3 izolatında, 0,0005 mg/mL sanguinarine’in ve 0,008 mg/mL askorbik asitin (1/16 MİK) tek uygulamaları ile bu bileşenlerin kombinasyonlarının (1/16 MİK SAN ve 1/16 MİK AA) uygulamasında anlamlı bir antibakteriyel etkinliğin olmadığı gözlemlenmiştir ($p > 0,05$) (Çizelge 4.7) (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. 1/16 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA3 izolatının büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit. SAN: Sanguinarine.

Çizelge 4.7. MSSA3 izolatu üzerindeki Sanguinarine ve Askorbik Asit kombinasyonlarının etkisi.

	Sanguinarine ve Askorbik Asit Tek ve Kombinasyon Uygulamaları	Log Siklüs (cfu/mL) Ort±SD	P
MSSA 3	Bakteri Kontrol	6,823 ^a ±0,271	
MİK	MİK SAN (0,008 mg/mL)	3,603 ^b ±0,238	p=0,029*
	MİK AA (0,128 mg/mL)	Tespit Edilemedi	
	MİK SAN+MİK AA	Tespit Edilemedi	
1/2 MİK	1/2 MİK SAN (0,004 mg/mL)	5,820 ^a ±0,089	p=0,029*
	1/2 MİK AA (0,064 mg/mL)	2,266 ^b ±0,079	
	1/2 MİK SAN+ 1/2 MİK AA	Tespit Edilemedi	
1/4 MİK	1/4 MİK SAN (0,002 mg/mL)	5,932 ^{bc} ±0,691	Pp=0,042*
	1/4 MİK AA (0,032 mg/mL)	5,626 ^{ac} ±0,121	
	1/4 MİK SAN+1/4 MİK AA	4,177 ^d ±0,111	
1/8 MİK	1/8 MİK SAN (0,001 mg/mL)	6,584 ^a ±0,046	p=0,042*
	1/8 MİK AA (0,016 mg/mL)	5,824 ^{bd} ±0,086	
	1/8 MİK SAN+ 1/8 MİK AA	5,539 ^{cd} ±0,114	
1/16 MİK	1/16 MİK SAN (0,0005 mg/mL)	6,687 ^a ±0,082	p=0,086
	1/16 MİK AA (0,008 mg/mL)	6,460 ^a ±0,369	
	1/16 MİK SAN+1/16 MİK AA	5,844 ^a ±0,070	

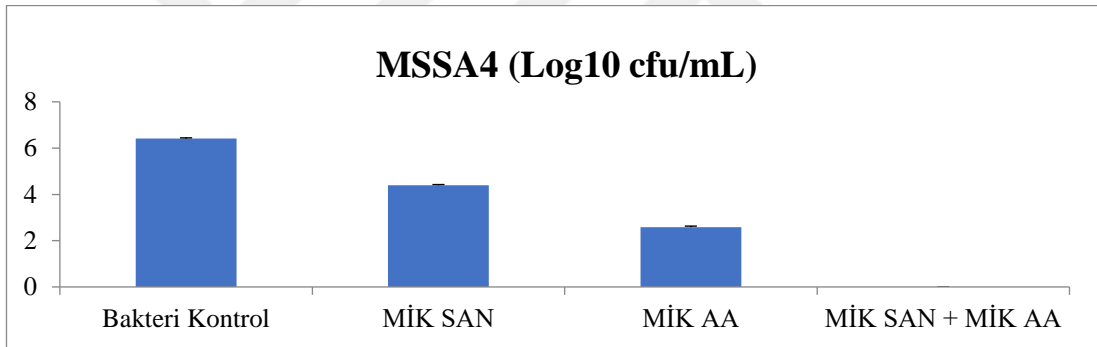
Her farklı harf, gruplar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir (*p<0,05). AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma (Standard deviation).

4.5.4. MSSA4

MSSA4 izolatu üzerinde sanguinarine ve askorbik asit kombinasyonlarının 0,6990 FİK indeksiyle kısmi sinerjistik etki gösterdiği belirlendi (Çizelge 4.4). Sırasıyla, 0,0005 mg/mL, 0,00025 mg/mL, 0,000125 mg/mL, 0,0000625 mg/mL (1/2 MİK, 1/4 MİK, 1/8 MİK, 1/16 MİK) sanguinarine'in alt-inhibitör konsantrasyonları ile 0,064 mg/mL, 0,032 mg/mL 0,016 mg/mL, 0,008 mg/mL (1/2 MİK, 1/4 MİK, 1/8

MİK, 1/16 MİK) askorbik asitin alt-inhibitör konsantrasyonları arasında kısmi sinerjistik aktivite görülmüştür. Uygulanan her tekrardan sonra aynı sonuçlar elde edilmiştir. MSSA4 izolatının askorbik asit ile sanguinarine'in alt inhibisyon konsantrasyonlarının tek uygulamalarına göre etkinliğinin daha fazla olduğu görülmüştür.

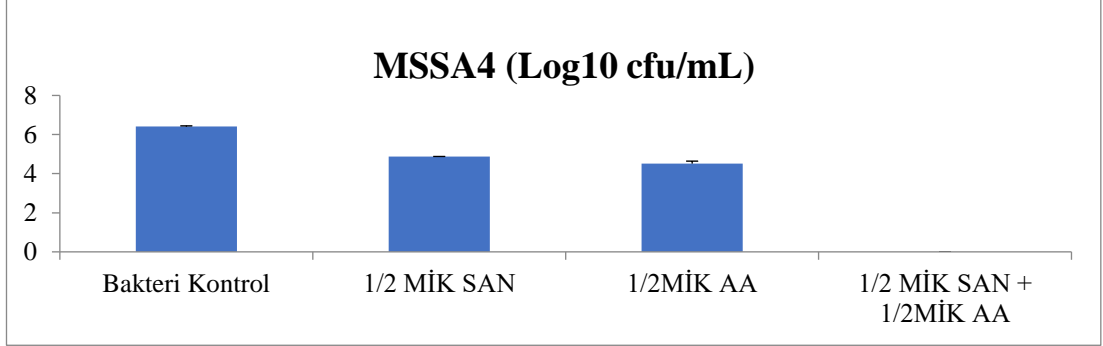
MSSA4 izolatında, 0,001 mg/mL sanguinarine'in (MİK SAN) ve 0,128 mg/mL askorbik asitin (MİK AA) tek uygulamaları kontrole göre sırasıyla, 2,023 log ve 3,833 log siklüs düşüğe neden olmuştur ($p<0,05$). 0,001 mg/mL sanguinarine ile 0,128 mg/mL askorbik asitin (MİK SAN ve MİK AA) kombinasyon uygulaması MSSA4 izolatını tamamen öldürüp, bakterisidal etki gösterdiği gözlemlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.8) (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA4 izolatının büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

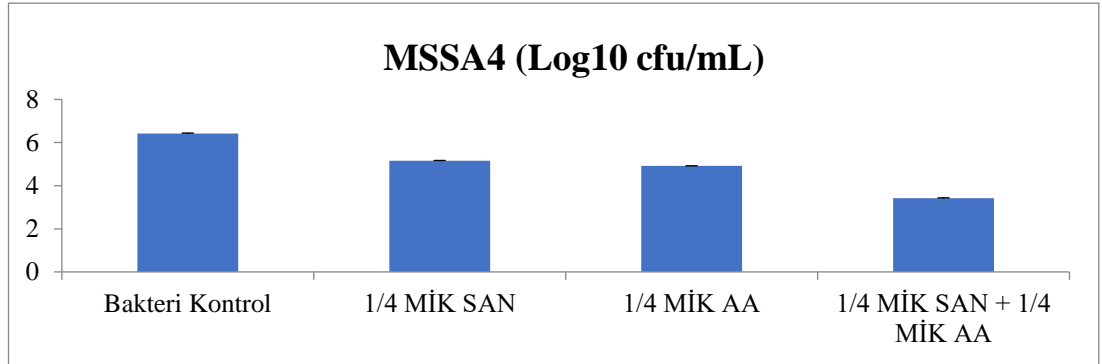
MSSA4 izolatında, 0,0005 mg/mL sanguinarine'in (1/2 MİK SAN) ve 0,064 mg/mL askorbik asitin (1/2 MİK AA) tek uygulamaları sonucunda kontrole göre sırasıyla, anlamlı bir şekilde 1,547 log ve 1,904 log siklüs düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,05$).

0,0005 mg/mL sanguinarine ile 0,064 mg/mL askorbik asitin (1/2 MİK SAN ve 1/2 MİK AA) kombinasyon uygulamasında, bu kombinasyonun MSSA4 izolatını tamamen öldürüp, bakterisidal etki gösterdiği gözlemlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.8) (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. 1/2 MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA4 izolatının büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

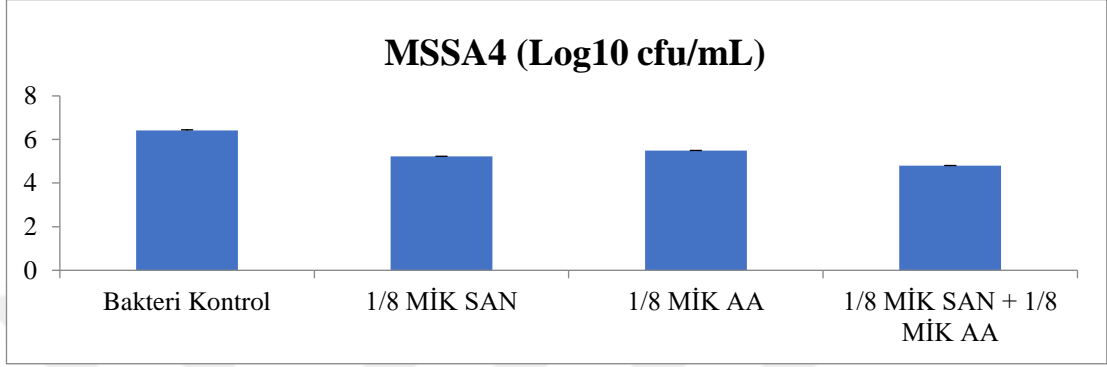
MSSA4 izolatında, 0,00025 mg/mL sanguinarine'in (1/4 MİK SAN) tek uygulaması kontrole göre 1,259 log siklus düşürmüştür ($p < 0,05$). 0,032 mg/mL askorbik asitin (1/4 MİK AA) tek uygulamasında ise kontrole göre 1,503 log siklus düşüş gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). 0,00025 mg/mL sanguinarine ile 0,032 mg/mL askorbik asitin (1/4 MİK SAN ve 1/4 MİK AA) kombinasyon uygulamasında, MSSA4 izolatı üzerinde, kontrole göre 2,999 log siklus düşüş gözlemlenmiştir ($p < 0,05$) (Çizelge 4.8) (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. 1/4 MİK'indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA4 izolatının büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

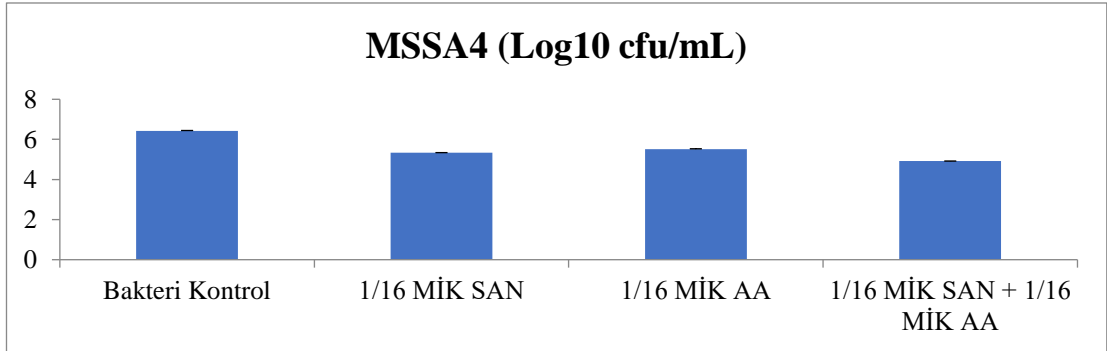
MSSA4 izolatında, 0,000125 mg/mL sanguinarine'in (1/8 MİK SAN) tek uygulaması, kontrole göre anlamlı olmayan bir şekilde 1,191 log siklus düşüş göstermiştir ($p > 0,05$). 0,016 mg/mL askorbik asitin (1/8 MİK AA) tek uygulaması ise anlamlı bir şekilde 0,931 log siklus düşürmüştür ($p < 0,05$). 0,001 mg/mL sanguinarine ile 0,016 mg/mL askorbik asitin (1/8 MİK SAN ve 1/8 MİK AA) kombinasyon

uygulamasını ise kontrole göre anlamlı bir şekilde 1,616 log log siklus düşüş göstermiştir ($p < 0,05$) (Çizelge 4.8) (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. 1/8 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA4 izolatının büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit. SAN: Sanguinarine.

MSSA4 izolatında, 0,0000625 mg/mL sanguinarine ile 0,008 mg/mL askorbik asitin (1/16 MİK) tek uygulamaları ve bu bileşenlerin 1/16 MİK’lerindeki kombinasyonlarının uygulamaları, MSSA4 izolatı üzerinde anlamlı bir antibakteriyel etkinliğin olmadığını göstermiştir ($p > 0,05$) (Çizelge 4.8) (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. 1/16 MİK’indeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının MSSA4 izolatının büyüme oranına etkisi. AA: Askorbik Asit. SAN: Sanguinarine.

Çizelge 4.8. MSSA4 izolatu üzerindeki Sanguinarine ve Askorbik Asit kombinasyonlarının etkisi.

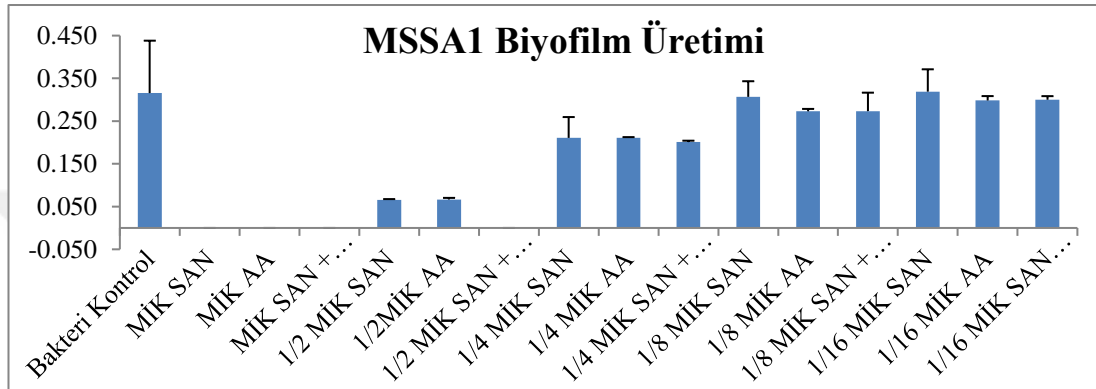
	Sanguinarine ve Askorbik Asit Tek ve Kombinasyon Uygulamaları	Log Siklüs (cfu/mL) Ort±SD	P
MSSA 4	Bakteri Kontrol	6,420 ^a ±0,143	
MİK	MİK SAN (0,001 mg/mL)	4,397 ^b ±0,181	p=0,029*
	MİK AA (0,128 mg/mL)	2,587 ^c ±0,212	
	MİK SAN+MİK AA	Tespit Edilemedi	
1/2 MİK	1/2 MİK SAN (0,0005 mg/mL)	4,873 ^b ±0,045	p=0,042*
	1/2 MİK AA (0,064 mg/mL)	4,516 ^b ±0,814	
	1/2 MİK SAN+ 1/2 MİK AA	Tespit Edilemedi	
1/4 MİK	1/4 MİK SAN (0,00025 mg/mL)	5,161 ^b ±0,066	p=0,029*
	1/4 MİK AA (0,032 mg/mL)	4,917 ^c ±0,032	
	1/4 MİK SAN+1/4 MİK AA	3,421 ^d ±0,081	
1/8 MİK	1/8 MİK SAN (0,000125 mg/mL)	5,229 ^b ±0,007	p=0,042*
	1/8 MİK AA (0,016 mg/mL)	5,489 ^c ±0,051	
	1/8 MİK SAN+ 1/8 MİK AA	4,804 ^d ±0,022	
1/16 MİK	1/16 MİK SAN (0,0000625 mg/mL)	5,330 ^a ±0,066	p=0,086
	1/16 MİK AA (0,008 mg/mL)	5,518 ^a ±0,076	
	1/16 MİK SAN+ 1/16 MİK AA	4,918 ^a ±0,017	

Her farklı harf, gruplar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir (*p<0,05). AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma (Standard deviation).

4.6. *S. aureus* İzolatları Üzerindeki Sanguinarine ve Askorbik Asitin Biyofilm Üretimi Üzerindeki Etkisi

MSSA1 suşunda, 0,002 mg/mL sanguinarine'in (1/2 MİK SAN) tek uygulaması, kontrole göre 0,25 nm düşüş göstermiştir (p>0,05). 0,128 mg/mL askorbik asitin (1/2 MİK AA) tek uygulamasında ise kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 0,24 nm düşüş gözlemlenmiştir (p<0,05). 0,002 mg/mL

sanguinarine ile 0,128 mg/mL askorbik asitin (1/2 MİK SAN ve 1/2 MİK AA) kombinasyon uygulamasında ise, bu kombinasyonun MSSA1 suşunu tamamen öldürüp, bakterisidal etki gösterdiği gözlemlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.9) (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA1 suşunun biyofilm üretimi üzerindeki etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon.

MSSA1 suşu üzerinde, 0,001 mg/mL sanguinarine'in (1/4 MİK SAN) tek uygulaması kontrole göre 0,074 nm düşüş göstermiştir ($p>0,05$). 0,064 mg/mL askorbik asitin (1/4 MİK AA) tek uygulamasında anlamlı olarak 0,105 nm düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 0,001 mg/mL sanguinarine ile 0,064 mg/mL askorbik asitin (1/4 MİK SAN ve 1/4 MİK AA) kombinasyon etkisi, bu kombinasyonu oluşturan bileşenlerin tek uygulamalarının etkinliğinden daha fazla olup, kontrole göre 0,115 nm düşüş göstermiştir ($p<0,005$) (Çizelge 4.9) (Şekil 4.22).

MSSA1 suşu üzerinde, 0,0005 mg/mL sanguinarine'in (1/8 MİK SAN) ve 0,032 mg/mL askorbik asitin (1/8 MİK AA) tek uygulamalarının etkinliklerinin istatistiksel olarak anlamsız olduğu gözlemlenmiştir ($p>0,05$). 0,0005 mg/mL sanguinarine ile 0,032 mg/mL askorbik asitin (1/8 MİK SAN ve 1/8 MİK AA) kombinasyon etkisi, kontrole göre 0,043 nm düşüş göstermiştir ($p>0,05$) (Çizelge 4.9) (Şekil 4.22).

MSSA1 suşu üzerinde, 0,00025 mg/mL sanguinarine (1/16 MİK SAN) ile 0,016 mg/mL askorbik asitin (1/16 MİK AA) tek uygulamaları ve bu bileşenlerin

kombinasyon uygulamalarının kontrole göre, anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı gözlemlenmiştir ($p>0,05$) (Çizelge 4.9) (Şekil 4.22).

Çizelge 4.9. Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA1 suşunun biyofilm üretimi üzerindeki etkisi.

	Sanguinarine ve Askorbik Asit Tek ve Kombinasyon Uygulamaları	OD (570nm) Ort±SD	P
MSSA 1	Bakteri Kontrol	0,316 ^a ±0,038	
MİK	MİK SAN (0,004 mg/mL)	Tespit Edilemedi	
	MİK AA (0,256 mg/mL)	Tespit Edilemedi	
	MİK SAN+MİK AA	Tespit Edilemedi	
1/2 MİK	1/2 MİK SAN (0,002 mg/mL)	0,066 ^b ±0,006	p <0,048*
	1/2 MİK AA (0,128 mg/mL)	0,067 ^b ±0,001	
	1/2 MİK SAN+ 1/2 MİK AA	Tespit Edilemedi	
1/4 MİK	1/4 MİK SAN (0,001 mg/mL)	0,242 ^{ab} ±0,015	p=0,029*
	1/4 MİK AA (0,064 mg/mL)	0,211 ^b ±0,000	
	1/4 MİK SAN+1/4 MİK AA	0,201 ^c ±0,001	
1/8 MİK	1/8 MİK SAN (0,0005 mg/mL)	0,307 ^a ±0,011	p =0,060
	1/8 MİK AA (0,032 mg/mL)	0,273 ^a ±0,001	
	1/8 MİK SAN+1/8 MİK AA	0,273 ^a ±0,013	
1/16 MİK	1/16 MİK SAN (0,00025 mg/mL)	0,319 ^a ±0,016	p >0,172
	1/16 MİK AA (0,016 mg/mL)	0,298 ^a ±0,003	
	1/16 MİK SAN+1/16 MİK AA	0,300 ^a ±0,002	

Her farklı harf, gruplar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir (* $p<0,05$). AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma (Standard deviation), OD: Optik Dansite.

MSSA2 izolatında, 0,002 mg/mL sanguinarine'in (1/2 MİK SAN) tek uygulamasında kontrole göre 0,195 nm düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 0,016 mg/mL askorbik asitin (1/2 MİK AA) tek uygulamasında kontrole göre istatistiksel olarak, anlamlı bir şekilde 0,21 nm düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 0,002 mg/mL

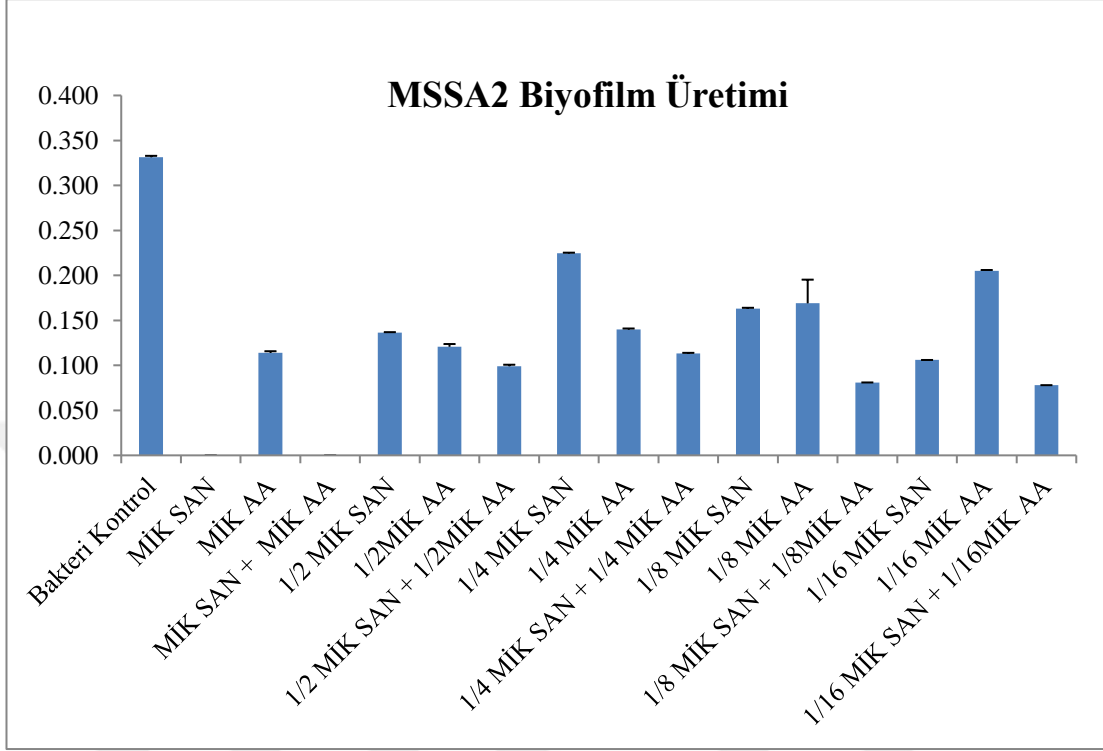
sanguinarine ile 0,016 mg/mL askorbik asitin (1/2 MİK SAN ve 1/2 MİK AA) kombinasyon etkisi, bu kombinasyonu oluşturan bileşenlerin tek uygulamalarının etkinliğinden daha fazla olup, en etkin doza göre 21 nm daha etkin düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.10) (Şekil 4.23).

MSSA2 izolatında, 0,001 mg/mL sanguinarine'in (1/4 MİK SAN) tek uygulaması kontrole göre 0,106 nm düşüş göstermiştir.

0,008 mg/mL askorbik asitin (1/4 MİK AA) tek uygulamasında ise MSSA2 izolatı üzerindeki etkinliği istatistiksel olarak anlamlı olup ($p<0,05$), kontrole göre MSSA2 izolatında, 0,191 nm düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 0,001 mg/mL sanguinarine ile 0,008 mg/mL askorbik asitin (1/4 MİK SAN ve 1/4 MİK AA) kombinasyon etkisi kontrole göre MSSA2 izolatında, 0,218 nm düşüş göstermiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.10) (Şekil 4.23).

MSSA2 izolatında, 0,0005 mg/mL sanguinarine'in (1/8 MİK SAN) tek uygulaması, kontrole göre 0,168 nm düşüş göstermiştir. 0,004 mg/mL askorbik asitin (1/8 MİK AA) tek uygulaması ise kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 0,162 nm düşüş göstermiştir. 0,0005 mg/mL sanguinarine ile 0,004 mg/mL askorbik asitin (1/8 MİK SAN ve 1/8 MİK AA) kombinasyon uygulaması, kontrole göre MSSA2 izolatında, 0,25 nm düşüş göstermiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.10) (Şekil 4.23).

MSSA2 izolatında, 0,00025 mg/mL sanguinarine'in (1/16 MİK SAN) tek uygulaması kontrole göre, 0,225 nm düşüş göstermiştir ($p<0,05$). 0,002 mg/mL askorbik asitin (1/16 MİK AA) tek uygulaması ise kontrole göre 0,126 nm düşüş göstermiştir ($p<0,05$). 0,00025 mg/mL sanguinarine ile 0,002 mg/mL askorbik asitin (1/16 MİK SAN ve 1/16 MİK AA) kombinasyon uygulamaları kontrole göre MSSA2 izolatında, 0,253 nm düşüş göstermiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.10) (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA2 izolatının biyofilm üretimi üzerindeki etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon.

Çizelge 4.10. Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA2 izolatının biyofilm üretimi üzerindeki etkisi.

	Sanguinarine ve Askorbik Asit Tek ve Kombinasyon Uygulamaları	OD (570nm) Ort±SD	P
MSSA 2	Bakteri Kontrol	0,331 ^a ±0,001	
MİK	MİK SAN (0,004 mg/mL)	Tespit Edilemedi	
	MİK AA (0,032 mg/mL)	0,114 ^b ±0,001	
	MİK SAN+MİK AA	Tespit Edilemedi	
1/2 MİK	1/2 MİK SAN (0,002 mg/mL)	0,136 ^b ±0,000	p<0,029*
	1/2 MİK AA (0,016 mg/mL)	0,121 ^c ±0,003	
	1/2 MİK SAN+ 1/2 MİK AA	0,099 ^d ±0,001	

Her farklı harf, gruplar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir (*p<0,05). AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma (Standard deviation), OD: Optik Dansite.

Çizelge 4.10. (Devam) Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA2 izolatının biyofilm üretimi üzerindeki etkisi.

1/4 MİK	1/4 MİK SAN (0,001 mg/mL)	0,225 ^b ±0,000	<0,029*
	1/4 MİK AA (0,008 mg/mL)	0,140 ^c ±0,001	
	1/4 MİK SAN+1/4 MİK AA	0,113 ^d ±0,000	
1/8 MİK	1/8 MİK SAN (0,0005 mg/mL)	0,163 ^b ±0,001	p<0,042*
	1/8 MİK AA (0,004 mg/mL)	0,169 ^b ±0,026	
	1/8 MİK SAN+1/8 MİK AA	0,081 ^c ±0,000	
1/16 MİK	1/16 MİK SAN (0,00025 mg/mL)	0,106 ^b ±0,000	p=0,029*
	1/16 MİK AA (0,002 mg/mL)	0,205 ^c ±0,000	
	1/16 MİK SAN+1/16 MİK AA	0,078 ^d ±0,000	

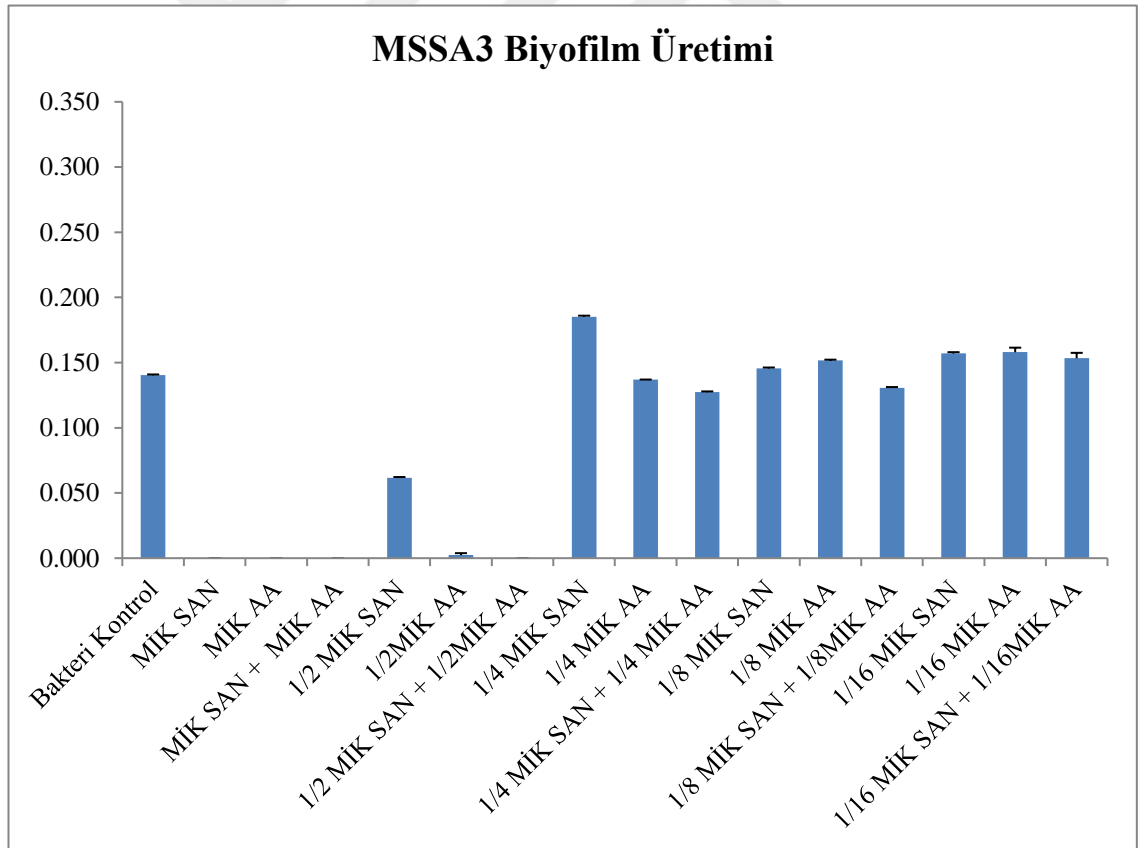
Her farklı harf, gruplar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir (*p<0,05). AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma (Standard deviation), OD: Optik Dansite.

MSSA3 izolatı üzerindeki, 0,004 mg/mL sanguinarine'in (1/2 MİK SAN) tek uygulamasında kontrole göre 0,078 nm düşüş gözlemlenmiştir (p<0,05). 0,064 mg/mL askorbik asitin (1/2 MİK AA) tek uygulamasında ise kontrole göre 138 nm düşüş gözlemlenmiştir. 0,004 mg/mL sanguinarine ile 0,064 mg/mL askorbik asitin (1/2 MİK SAN ve 1/2 MİK AA) kombinasyon uygulaması MSSA3 izolatını tamamen öldürüp, bakterisidal etki göstermiştir (Çizelge 4.11) (Şekil 4.24).

MSSA3 izolatında, 0,032 mg/mL askorbik asitin (1/4 MİK AA) tek uygulamasında kontrole göre 0,003 nm düşüş gözlemlenmiştir. 0,002 mg/mL sanguinarine'in (1/4 MİK SAN) tek uygulamasında ise kontrole göre 0,045 nm artış gözlemlenmiştir (p<0,05) (Çizelge 4.11) (Şekil 4.24). MSSA3 izolatında, 0,002 mg/mL sanguinarine (1/4 MİK SAN) ile 0,032 mg/mL askorbik asitin (1/4 MİK AA) kombinasyon uygulamasında anlamlı olarak kontrole göre 13 nm düşüş gözlemlenmiştir (p<0,05) (Çizelge 4.11) (Şekil 4.24).

MSSA3 izolatında, 0,001 mg/mL sanguinarine'in (1/8 MİK SAN) tek uygulamasında kontrole göre 0,006 nm artış gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 0,016 mg/mL askorbik asitin (1/8 MİK AA) tek uygulamasında 0,012 nm artış gözlemlenmiştir ($p<0,05$). MSSA3 izolatında, 0,001 mg/mL sanguinarine (1/8 MİK SAN) ile 0,016 mg/mL askorbik asitin (1/8 MİK AA) kombinasyon uygulamasında en etkin doza göre, anlamlı olarak 15 nm düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.11) (Şekil 4.24).

MSSA3 izolatı üzerinde, 0,0005 mg/mL sanguinarine (1/16 MİK SAN) ile 0,008 mg/mL askorbik asitin (1/16 MİK AA) tek uygulamaları ve bu bileşenlerin 1/16 MİK kombinasyon uygulamalarının kontrole göre, anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı gözlemlenmiştir ($p>0,05$) (Çizelge 4.11) (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA3 izolatının biyofilm üretimi üzerindeki etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon.

Çizelge 4.11. Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA3 izolatının biyofilm üretimi üzerindeki etkisi.

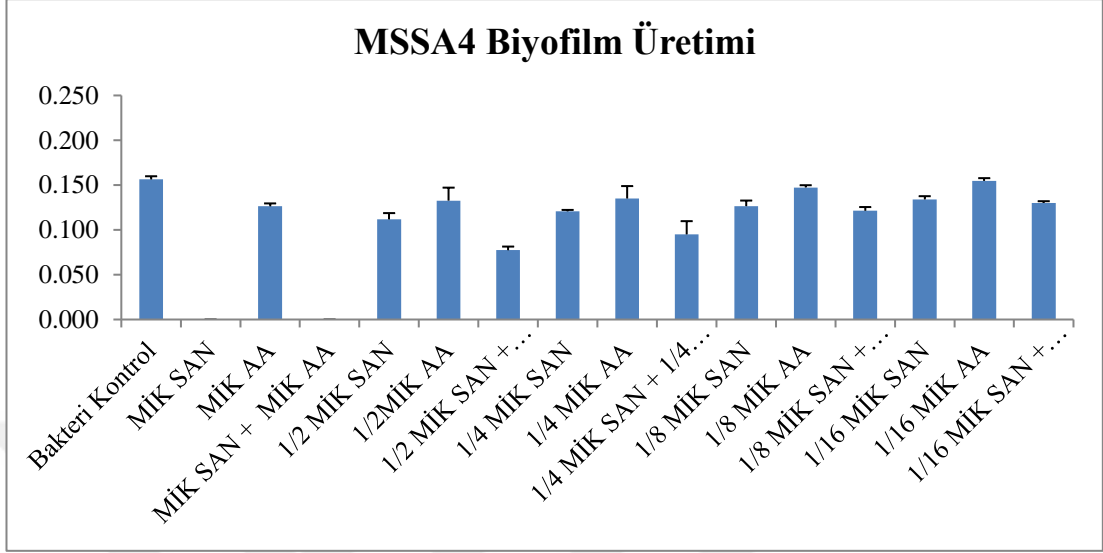
	Sanguinarine ve Askorbik Asit Tek ve Kombinasyon Uygulamaları	OD (570nm) Ort±SD	P
MSSA 3	Bakteri Kontrol	0,140 ^a ±0,000	
MİK	MİK SAN (0,008 mg/mL)	Tespit Edilemedi	p=0,043*
	MİK AA (0,128 mg/mL)	Tespit Edilemedi	
	MİK SAN+MİK AA	Tespit Edilemedi	
1/2 MİK	1/2 MİK SAN (0,004 mg/mL)	0,062 ^b ±0,000	p=0,048*
	1/2 MİK AA (0,064 mg/mL)	0,002 ^c ±0,001	
	1/2 MİK SAN+1/2 MİK AA	Tespit Edilemedi	
1/4 MİK	1/4 MİK SAN (0,002 mg/mL)	0,185 ^b ±0,001	p=0,029*
	1/4 MİK AA (0,032 mg/mL)	0,137 ^c ±0,001	
	1/4 MİK SAN+1/4 MİK AA	0,127 ^d ±0,000	
1/8 MİK	1/8 MİK SAN (0,001 mg/mL)	0,146 ^b ±0,006	p=0,029*
	1/8 MİK AA (0,016 mg/mL)	0,152 ^c ±0,000	
	1/8 MİK SAN+1/8 MİK AA	0,131 ^d ±0,000	
1/16 MİK	1/16 MİK SAN (0,0005 mg/mL)	0,157 ^b ±0,001	p=0,051
	1/16 MİK AA (0,008 mg/mL)	0,158 ^b ±0,003	
	1/16 MİK SAN+1/16 MİK AA	0,153 ^b ±0,004	

Her farklı harf, gruplar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir (*p<0,05). AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma (Standard deviation), OD: Optik Dansite.

MSSA4 izolatında, 0,0005 mg/mL sanguinarine'in (1/2 MİK SAN) tek uygulamasında kontrole göre istatistiksel olarak anlamsız bir düşüş gözlemlenmiştir

($p>0,05$). 0,064 mg/mL askorbik asitin (1/2 MİK askorbik asit) tek uygulamasında kontrole göre, istatistiksel ve anlamlı olarak 0,023 nm düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,05$). MSSA4 izolatında, 0,0005 mg/mL sanguinarine ile 0,064 mg/mL askorbik asitin (1/2 MİK SAN ve 1/2 MİK AA) kombinasyon uygulamasında, anlamlı bir şekilde, en etkin doza göre 0,035 nm düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.12) (Şekil 4.25).

MSSA4 izolatında, 0,00025 mg/mL sanguinarine'in (1/4 MİK SAN) tek uygulamasında kontrole göre, 0,035 nm istatistiksel olarak anlamsız bir düşüş gözlemlenmiştir ($p>0,05$). 0,032 mg/mL askorbik asitin (1/4 MİK AA) tek uygulamasında ise istatistiksel olarak kontrole göre 0,021 nm anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 0,00025 mg/mL sanguinarine ile 0,032 mg/mL askorbik asitin (1/4 MİK SAN ve 1/4 MİK AA) kombinasyon uygulamasında kontrole göre MSSA4 izolatında, 0,061 nm düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.12) (Şekil 4.25). MSSA4 izolatında, 0,000125 mg/mL sanguinarine'in (1/8 MİK SAN) tek uygulamasında istatistiksel olarak kontrole göre, 0,029 nm anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 0,016 mg/mL askorbik asitin (1/8 MİK AA) tek uygulamasında ise istatistiksel olarak kontrole göre, 0,009 nm anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 0,000125 mg/mL sanguinarine ile 0,016 mg/mL askorbik asitin (1/8 MİK SAN ve 1/8 MİK AA) kombinasyon uygulamasında kontrole göre MSSA4 izolatında, 0,035 nm düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.12) (Şekil 4.25). MSSA4 izolatı üzerinde, 0,0000625 mg/mL sanguinarine (1/16 MİK SAN) ile 0,008 mg/mL askorbik asitin (1/16 MİK AA) tek uygulamaları ve bu bileşenlerin 1/16 MİK kombinasyon uygulamalarının kontrole göre, anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı gözlemlenmiştir ($p>0,05$) (Çizelge 4.12) (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA4 izolatının biyofilm üretimi üzerindeki etkisi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon.

Çizelge 4.12. Sanguinarine ve Askorbik Asit bileşenlerinin MSSA4 izolatının biyofilm üretimi üzerindeki etkisi.

	Sanguinarine ve Askorbik Asit Tek ve Kombinasyon Uygulamaları	OD (570nm) Ort±SD	P
MSSA 4	Bakteri Kontrol	0,156 ^a ±0,003	
MİK	MİK SAN (0,001 mg/mL)	Tespit Edilemedi	p=0,048*
	MİK AA (0,128 mg/mL)	0,126 ^b ±0,002	
	MİK SAN+MİK AA	Tespit Edilemedi	
1/2 MİK	1/2 MİK SAN (0,0005 mg/mL)	0,112 ^{ab} ±0,007	p=0,029*
	1/2 MİK AA (0,064 mg/mL)	0,133 ^b ±0,014	
	1/2 MİK SAN+ 1/2 MİK AA	0,077 ^c ±0,004	
1/4 MİK	1/4 MİK SAN (0,00025 mg/mL)	0,121 ^a ±0,001	p=0,026*
	1/4 MİK AA (0,032 mg/mL)	0,135 ^{ab} ±0,013	
	1/4 MİK SAN+1/4 MİK AA	0,095 ^b ±0,014	
1/8 MİK	1/8 MİK SAN (0,000125 mg/mL)	0,127 ^b ±0,006	p=0,029*
	1/8 MİK AA (0,016 mg/mL)	0,147 ^c ±0,002	
	1/8 MİK SAN+ 1/8 MİK AA	0,121 ^b ±0,004	
1/16 MİK	1/16 MİK SAN (0,0000625 mg/mL)	0,134 ^a ±0,003	p=0,060
	1/16 MİK AA (0,008 mg/mL)	0,155 ^a ±0,003	
	1/16 MİK SAN+ 1/16 MİK AA	0,130 ^a ±0,002	

Her farklı harf, gruplar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir (*p<0,05). AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma (Standard deviation), OD: Optik Dansite.

4.7. Sanguinarine ve Askorbik Asitin Olgun Biyofilm Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi (MBEK)

MSSA1 suşunda, MBEK çalışması sonucunda, 0,004 mg/mL sanguinarine (MİK SAN) tek uygulandığında %4 düşüş gözlemlenmiştir. 0,256 mg/mL askorbik asit (MİK AA) tek uygulandığında %30 düşüş gözlemlenmiştir. 0,004 mg/mL sanguinarine (MİK SAN) ile 0,256 mg/mL askorbik asit (MİK AA) kombine uygulandığında %19 düşüş gözlemlenmiştir. 0,002 mg/mL sanguinarine (1/2 MİK SAN) tek uygulandığında %24 düşüş gözlemlenmiştir. 0,128 mg/mL askorbik asit (1/2 MİK AA) tek uygulandığında %24 düşüş gözlemlenmiştir. 0,128 mg/mL askorbik asit (1/2 MİK AA) ile 0,002 mg/mL sanguinarine (1/2 MİK SAN) kombine uygulandığında %52 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. 0,001 mg/mL sanguinarine (1/4 MİK SAN) tek uygulandığında %47 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,0064 mg/mL askorbik asit (1/4 MİK AA) tek uygulandığında %9 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,001 mg/mL sanguinarine (1/4 MİK SAN) ile 0,0064 mg/mL askorbik asit (1/4 MİK AA) kombine uygulandığında %35 düşüş gözlemlenmiştir. 0,0005 mg/mL sanguinarine (1/8 MİK SAN) tek uygulandığında %29 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. 0,032 mg/mL askorbik asit (1/8 MİK AA) tek uygulandığında %18 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,0005 mg/mL sanguinarine (1/8 MİK SAN) ile 0,032 mg/mL askorbik asit (1/8 MİK AA) kombine uygulandığında %33 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,00025 mg/mL sanguinarine (1/16 MİK SAN) tek uygulandığında %35 oranında bir azalış gözlemlenmiştir. 0,016 mg/mL askorbik asit (1/16 MİK AA) tek uygulandığında %13 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,00025 mg/mL sanguinarine (1/16 MİK SAN) ile 0,016 mg/mL askorbik asit (1/16 MİK AA) kombine uygulandığında %22 oranında azalma gözlemlenmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Sanguinarine ve Askorbik Asitin bileşenlerinin MSSA1 suşunun olgun biyofilmi üzerindeki etkisi.

	Sanguinarine ve Askorbik Asit Tek ve Kombinasyon Uygulamaları	OD (570nm) Ort±SD
MSSA 1	Bakteri Kontrol	1,268±0,012
MİK	MİK SAN (0,004 mg/mL)	1,208±0,006 (%4)
	MİK AA (0,256 mg/mL)	0,863±0,010 (%30)
	MİK SAN+MİK AA	1,013±0,004 (%19)
1/2 MİK	1/2 MİK SAN (0,002 mg/mL)	0,942±0,028 (%24)
	1/2 MİK AA (0,128 mg/mL)	0,936±0,002 (%24)
	1/2 MİK SAN+ 1/2 MİK AA	0,570±0,005 (%52)
1/4 MİK	1/4 MİK SAN (0,001 mg/mL)	0,594±0,018 (%47)
	1/4 MİK AA (0,064 mg/mL)	1,144±0,007 (%9)
	1/4 MİK SAN+1/4 MİK AA	0,794±0,000 (%35)
1/8 MİK	1/8 MİK SAN (0,0005 mg/mL)	0,877±0,010 (%29)
	1/8 MİK AA (0,032 mg/mL)	1,029±0,004 (%18)
	1/8 MİK SAN+1/8 MİK AA	0,820±0,002 (%33)
1/16 MİK	1/16 MİK SAN (0,00025 mg/mL)	0,791±0,008 (%35)
	1/16 MİK AA (0,016 mg/mL)	1,093±0,000 (%13)
	1/16 MİK SAN+1/16 MİK AA	0,973±0,014 (%22)

AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma (Standard deviation), OD: Optik Dansite.

MSSA2 izolatında, MBEK çalışması sonucunda, 0,004 mg/mL sanguinarine (MİK SAN) tek uygulandığında %56 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,032 askorbik asit (MİK AA) tek uygulandığında %40 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,004 mg/mL sanguinarine (MİK SAN) ile 0,032 askorbik asit (MİK AA) kombine uygulandığında %46 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,002 mg/mL sanguinarine (1/2 MİK SAN) tek uygulandığında %65 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,016 mg/mL

askorbik asit (1/2 MİK AA) tek uygulandığında %34 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,002 mg/mL sanguinarine (1/2 MİK SAN) ile 0,016 mg/mL askorbik asit (1/2 MİK AA) kombine uygulandığında %43 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,001 mg/mL sanguinarine (1/4 MİK SAN) tek uygulandığında %68 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,008 mg/mL askorbik asit (1/4 MİK AA) tek uygulandığında %38 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. 0,001 mg/mL sanguinarine (1/4 MİK SAN) ile 0,008 mg/mL askorbik asit (1/4 MİK AA) kombine uygulandığında %42 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir.

0,0005 mg/mL sanguinarine (1/8 MİK SAN) tek uygulandığında %70 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. 0,004 mg/mL askorbik asit (1/8 MİK AA) tek uygulandığında %34 oranında bir düşüş gerçekleşmiştir. 0,0005 mg/mL sanguinarine (1/8 MİK SAN) ile 0,004 mg/mL askorbik asit (1/8 MİK AA) kombine uygulandığında %38 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. 0,00025 mg/mL tek sanguinarine (1/16 MİK) uygulandığında %70 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,002 mg/mL tek askorbik asit (1/16 MİK) uygulandığında %34 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,00025 mg/mL sanguinarine (1/16 MİK) ile 0,002 mg/mL askorbik asit (1/16 MİK) kombine uygulandığında %45 oranında düşüş gözlemlenmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Sanguinarine ve Askorbik Asitin MSSA2 izolatının olgun biyofilmi üzerindeki etkisi.

	Sanguinarine ve Askorbik Asit Tek ve Kombinasyon Uygulamaları	OD (570nm) Ort±SD
MSSA 2	Bakteri Kontrol	1,036±0,0035
MİK	MİK SAN (0,004 mg/mL)	0,408±0,0021 (%56)
	MİK AA (0,032 mg/mL)	0,589±0,00 (%40)
	MİK SAN+MİK AA	0,521±0,000 (%46)

AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma (Standard deviation), OD: Optik Dansite.

Çizelge 4.14. (Devam) Sanguinarine ve Askorbik Asitin MSSA2 izolatının olgun biyofilmi üzerindeki etkisi.

1/2 MİK	1/2 MİK SAN (0,002 mg/mL)	0,309±0,001 (%65)
	1/2 MİK AA (0,016 mg/mL)	0,654±0,002 (%34)
	1/2 MİK SAN+ 1/2 MİK AA	0,554±0,000 (%43)
1/4 MİK	1/4 MİK SAN (0,001 mg/mL)	0,280±0,000 (%68)
	1/4 MİK AA (0,008 mg/mL)	0,607±0,000 (%38)
	1/4 MİK SAN+1/4 MİK AA	0,563±0,000 (%42)
1/8 MİK	1/8 MİK SAN (0,0005 mg/mL)	0,259±0,000 (%70)
	1/8 MİK AA (0,004 mg/mL)	0,654±0,000 (%34)
	1/8 MİK SAN+1/8 MİK AA	0,615±0,000 (%38)
1/16 MİK	1/16 MİK SAN (0,00025 mg/mL)	0,260±0,003 (%70)
	1/16 MİK AA (0,002 mg/mL)	0,660±0,009(%34)
	1/16 MİK SAN+1/16 MİK AA	0,536±0,001 (%45)

AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma (Standard deviation), OD: Optik Dansite.

MSSA3 izolatında, MBEK çalışması sonucunda, 0,008 mg/mL sanguinarine (MİK SAN) tek uygulandığında %17 azalma gözlemlenmiştir. 0,128 mg/mL askorbik asit (MİK AA) tek uygulandığında %17 düşüş gözlemlenmiştir. 0,008 mg/mL sanguinarine (MİK SAN) ile 0,128 mg/mL askorbik asit (MİK AA) kombine uygulandığında %44 düşüş gözlemlenmiştir. 0,004 mg/mL sanguinarine (1/2 MİK SAN) tek uygulandığında %15 düşüş gözlemlenmiştir.

0,064 mg/mL askorbik asit (1/2 MİK AA) tek uygulandığında %70 düşüş gözlemlenmiştir. 0,004 mg/mL sanguinarine (1/2 MİK SAN) ile 0,064 mg/mL askorbik asit (1/2 MİK AA) birlikte uygulandığında %79 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,002 mg/mL sanguinarine (1/4 MİK SAN) tek uygulandığında %28 oranında bir azalış gözlemlenmiştir. 0,032 mg/mL askorbik asit (1/4 MİK AA) tek

uygulandığında ise %50 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. 0,002 mg/mL sanguinarine (1/4 MİK SAN) ile 0,032 mg/mL askorbik asit (1/4 MİK AA) birlikte uygulandığında ise %53 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,001 mg/mL sanguinarine (1/8 MİK SAN) tek uygulandığında %15 düşüş gözlemlenmiştir. 0,0016 mg/mL askorbik asit (1/8 MİK AA) tek uygulandığında %41 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,001 mg/mL sanguinarine (1/8 MİK SAN) ile 0,0016 mg/mL askorbik asit (1/8 MİK AA) kombinasyonu uygulandığında ise %43 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,0005 mg/mL sanguinarine (1/16 MİK SAN) tek uygulandığında %10 düşüş gözlemlenmiştir. 0,008 mg/mL askorbik asit (1/16 AA) tek uygulandığında %24 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,0005 mg/mL sanguinarine (1/16 MİK SAN) ile 0,008 mg/mL askorbik asit (1/16 MİK AA) birlikte uygulandığında %25 oranında düşüş gözlemlenmiştir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. Sanguinarine ve Askorbik Asitin MSSA3 izolatının olgun biyofilmi üzerindeki etkisi.

	Sanguinarine ve Askorbik Asit Tek ve Kombinasyon Uygulamaları	OD (570nm) Ort±SD
MSSA 3	Bakteri Kontrol	1,392±0,000
MİK	MİK SAN (0,008 mg/mL)	1,147±0,000 (%17)
	MİK AA (0,128 mg/mL)	1,141±0,006 (%17)
	MİK SAN+MİK AA	0,747±0,001 (%44)
1/2 MİK	1/2 MİK SAN (0,004 mg/mL)	1,167±0,000 (%15)
	1/2 MİK AA (0,064 mg/mL)	0,361±0,006 (%70)
	1/2 MİK SAN+1/2 MİK AA	0,227±0,000 (%79)
1/4 MİK	1/4 MİK SAN (0,002 mg/mL)	1,236±0,006 (%28)
	1/4 MİK AA (0,032 mg/mL)	0,655±0,001(%50)
	1/4 MİK SAN+1/4 MİK AA	0,617±0,000 (%53)

AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma (Standard deviation), OD: Optik Dansite.

Çizelge 4.15. (Devam) Sanguinarine ve Askorbik Asitin MSSA3 izolatının olgun biyofilmi üzerindeki etkisi.

1/8 MİK	1/8 MİK SAN (0,001 mg/mL)	1,169±0,002 (%15)
	1/8 MİK AA (0,016 mg/mL)	0,784±0,005 (%41)
	1/8 MİK SAN+ 1/8 MİK AA	0,757±0,000 (%43)
1/16 MİK	1/16 MİK SAN (0,0005 mg/mL)	1,243±0,009 (%10)
	1/16 MİK AA (0,008 mg/mL)	1,041±0,018 (%24)
	1/16 MİK SAN+1/16 MİK AA	1,019±0,000 (%25)

AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma (Standard deviation), OD: Optik Dansite.

MSSA 4 izolatında, MBEK çalışması sonucunda, 0,001 mg/mL sanguinarine (MİK SAN) tek uygulandığında %21 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,128 mg/mL askorbik asit (MİK AA) tek uygulandığında %28 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,001 mg/mL sanguinarine (MİK SAN) ile 0,128 mg/mL askorbik asit (MİK AA) kombine uygulandığında %57 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,0005 mg/mL sanguinarine (1/2 MİK SAN) tek uygulandığında %11 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,064 mg/mL askorbik asit (1/2 MİK AA) tek uygulandığında %14 oranında azalış gözlemlenmiştir. 0,064 mg/mL askorbik asit (1/2 MİK AA) ile 0,0005 mg/mL sanguinarine (1/2 MİK SAN) kombine uygulandığında %25 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,00025 mg/mL sanguinarine (1/4 MİK SAN) tek uygulandığında %9 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,032 mg/mL askorbik asit (1/4 MİK AA) tek uygulandığında %12 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,00025 mg/mL sanguinarine (1/4 MİK SAN) ve 0,032 mg/mL askorbik asit (1/4 MİK AA) kombine uygulandığında %16 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. 0,000125 mg/mL sanguinarine (1/8 MİK SAN) tek uygulandığında %69 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,016 mg/mL askorbik asit (1/8 MİK AA) tek uygulandığında %25 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. 0,000125 mg/mL sanguinarine ile 0,016 mg/mL askorbik asit (1/8 MİK AA) kombine uygulandığında %27 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,000625

mg/mL sanguinarine (1/16 MİK SAN) tek uygulandığında %19 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,008 mg/mL askorbik asit (1/16 AA) tek uygulandığında %34 oranında düşüş gözlemlenmiştir. 0,0000625 mg/mL sanguinarine (1/16 MİK SAN) ile 0,008 mg/mL askorbik asit (1/16 MİK AA) kombinasyonu uygulandığında %47 oranında düşüş gözlemlenmiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. Sanguinarine ve Askorbik Asitin MSSA4 izolatının olgun biyofilmi üzerindeki etkisi.

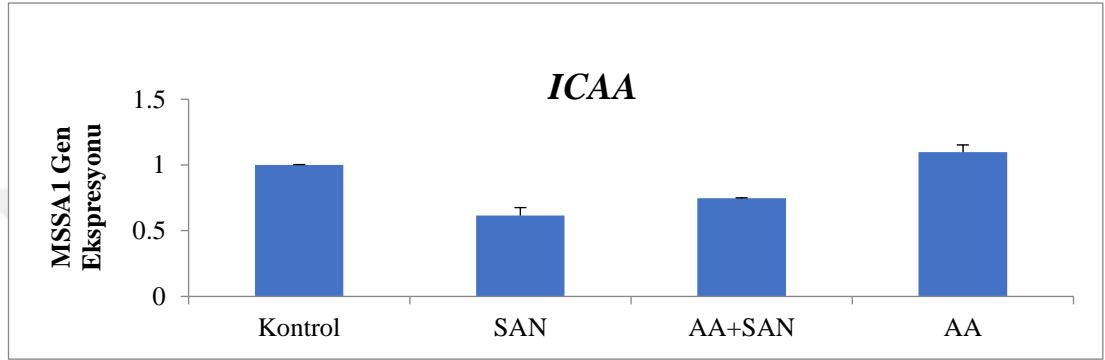
	Sanguinarine ve Askorbik Asit Tek ve Kombinasyon Uygulamaları	OD (570nm) Ort±SD
MSSA 4	Bakteri Kontrol	1,200±0,000
MİK	MİK SAN (0,001 mg/mL)	0,887±0,019 (%21)
	MİK AA (0,128 mg/mL)	0,800±0,005 (%28)
	MİK SAN+MİK AA	0,450±0,005 (%57)
1/2 MİK	1/2 MİK SAN (0,0005 mg/mL)	1,001±0,014 (%11)
	1/2 MİK AA (0,064 mg/mL)	0,967±0,000 (%14)
	1/2 MİK SAN+ 1/2 MİK AA	0840±0,000 (%25)
1/4 MİK	1/4 MİK SAN (0,00025 mg/mL)	1,027±0,000 (%9)
	1/4 MİK AA (0,032 mg/mL)	0,987±0,004 (%12)
	1/4 MİK SAN+1/4 MİK AA	0,948±0,005 (%16)
1/8 MİK	1/8 MİK SAN (0,000125 mg/mL)	0,309±0,007 (%69)
	1/8 MİK AA (0,016 mg/mL)	0,837±0,007 (%25)
	1/8 MİK SAN+ 1/8 MİK AA	0,817±0,000 (%27)
1/16 MİK	1/16 MİK SAN (0,0000625 mg/mL)	0,909±0,010 (%19)
	1/16 MİK AA (0,008 mg/mL)	0,730±0,002 (%34)
	1/16 MİK SAN+ 1/16 MİK AA	0,575±0,004 (%47)

AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma (Standard deviation), OD: Optik Dansite.

4.8. Sanguinarine ve Askorbik Asitin Biyofilm İlişkili Genlerin Ekspresyonları Üzerindeki Etkisi

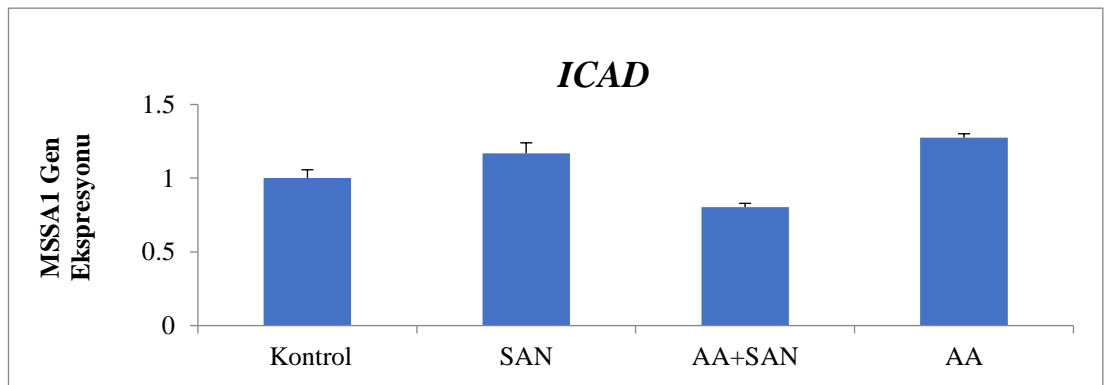
MSSA1 kontrol suşunda ajan uygulanmamış kontrol ile ajan uygulanmış suşun *icaA* gen ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, sanguinarine uygulanan suşun *icaA*

gen ekspresyon seviyesinde, kontrole göre %40 azalma olduğu gözlemlendi. Askorbik asit uygulanan suşun gen ekspresyon seviyesinde 1,09 kat artış gözlemlendi. Sanguinarine ve askorbik asitin kombine uygulaması ise kontrol ile kıyaslandığında *icaA* gen ekspresyon seviyesinde %30 azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. MSSA1 suşunda *IcaA* geni ekspresyon analizi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

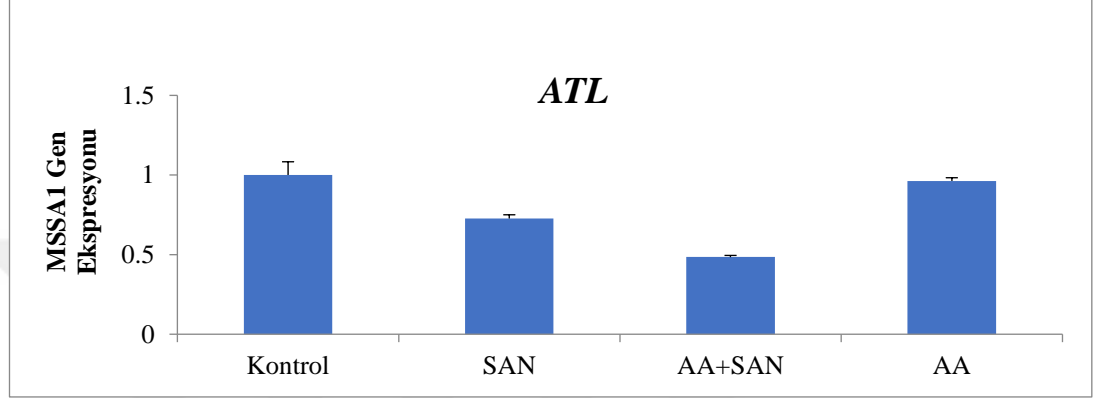
MSSA1 kontrol suşunda ajan uygulanmamış kontrol ile ajan uygulanmış suşun *icaD* gen ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, sanguinarine uygulanan suşta 1,16 kat artış gözlemlendi. Askorbik asit uygulanan MSSA1 suşunun gen ekspresyonu seviyesinde 1,27 kat artış gözlemlendi. Sanguinarine ile askorbik asitin kombine uygulamasında *icaD* gen ekspresyon seviyesinde yaklaşık %20 azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. MSSA1 suşunda *IcaD* geni ekspresyon analizi. AA: Askorbik asit, SAN: Sanguinarine.

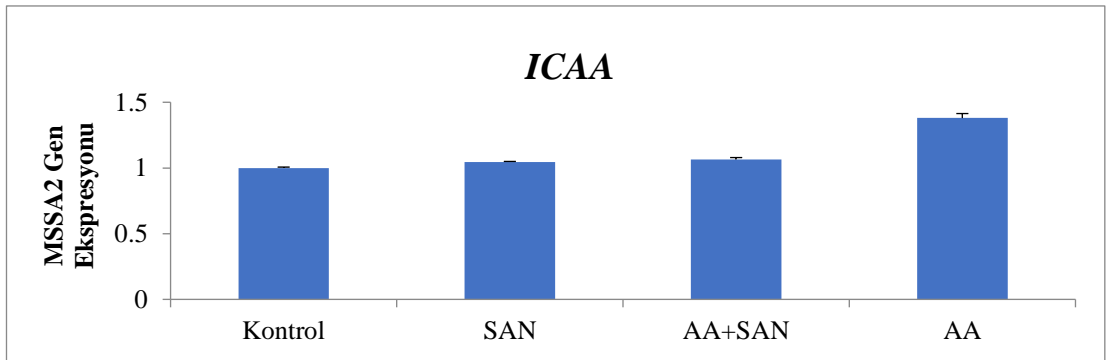
MSSA1 kontrol suşunun kontrolü ile ajan uygulanan suşun *atl* gen ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, sanguinarine uygulanan suşta yaklaşık %30 oranında azalma olduğu gözlemlendi. Askorbik asit ile muamele edilen suşun ise gen

ekspresyonunda %4 oranında azalma olduğu gözlemlendi. Sanguinarine ile askorbik asitin kombinasyon uygulamasında *atl* gen ekspresyon seviyesinde kontrol ile kıyaslandığında %60 oranında azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. MSSA1 suşunda *Atl* geni ekspresyon analizi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

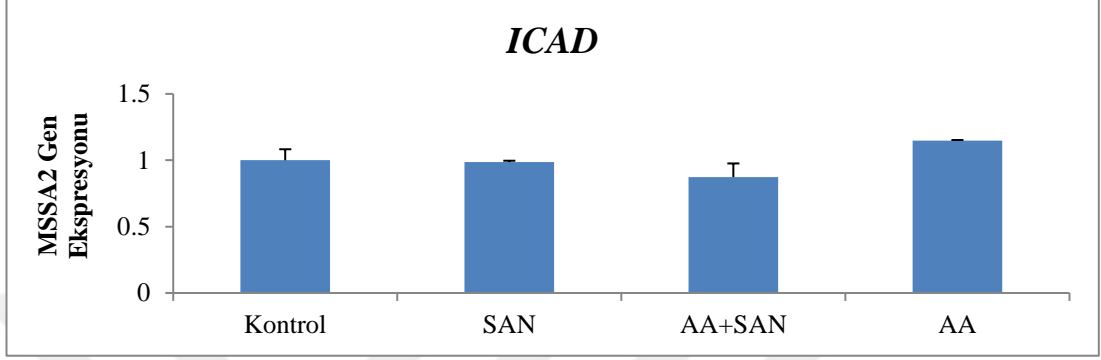
MSSA2 izolatının kontrolü ile ajan uygulanan izolatlarının *icaA* gen ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, sanguinarine uygulanan izolatın gen ekspresyon seviyesinde 1,04 kat artış gözlemlendi. Askorbik asit uygulanan izolatın gen ekspresyonunda 1,38 kat artış gözlemlendi. Sanguinarine ile askorbik asitin kombine uygulandığı *icaA* gen ekspresyon seviyesinde, kontrole göre 1,06 kat artış gözlemlendi (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. MSSA2 izolatında *IcaA* geni ekspresyon analizi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

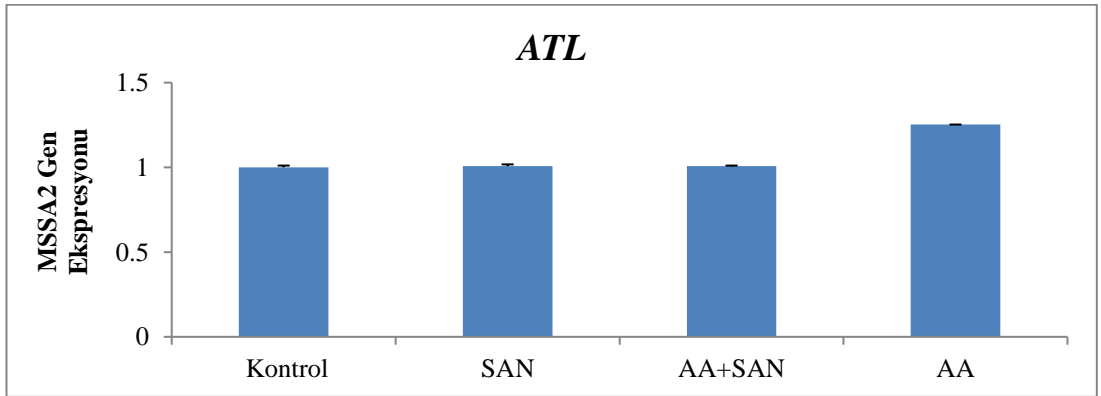
MSSA2 izolatının kontrolü ile ajan uygulanan izolatlarının *icaD* gen ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, sanguinarine uygulanan izolatla kontrole göre, %2 azalma olduğu gözlemlendi. Askorbik asit uygulanan izolatın gen ekspresyonunda

1,14 kat artış gözlemlendi. Sanguinarine ve askorbik asitin kombine uygulandığı *icaD* gen ekspresyon seviyesinde, kontrole göre %13 azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. MSSA2 izolatında *IcaD* geni ekspresyon analizi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

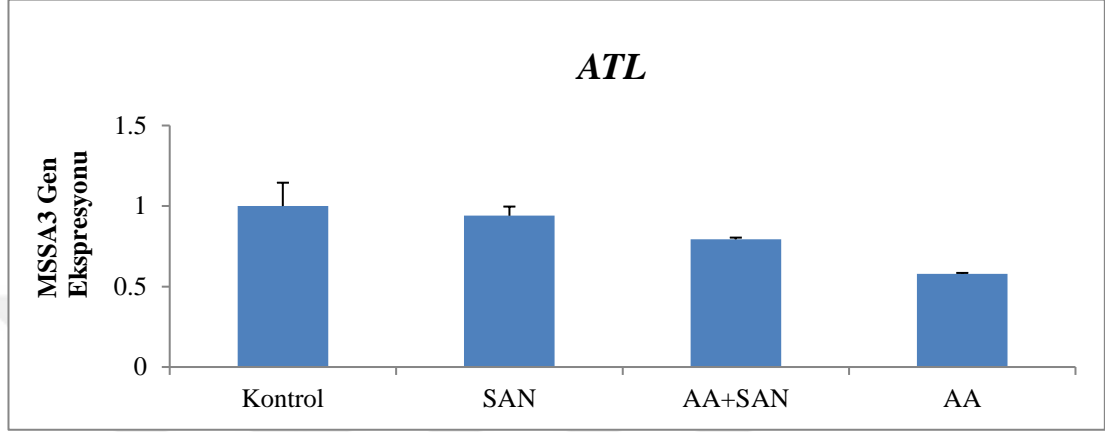
MSSA2 izolatının kontrolü ile ajan uygulanan izolatlarının *atl* gen ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, sanguinarine uygulanan izolatta, bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Sanguinarine ile askorbik asitin kombine uygulandığı izolatın, gen ekspresyon seviyesinde kontrole göre bir değişiklik gözlenmedi. Askorbik asit uygulanmış izolatın gen ekspresyonunda, kontrole göre, 1,25 kat artış gözlemlendi (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. MSSA2 izolatında *Atl* geni ekspresyon analizi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

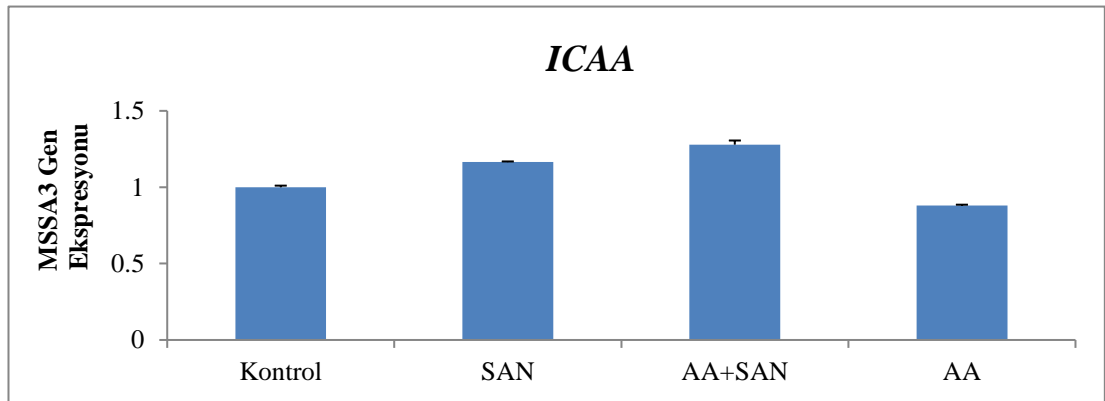
MSSA3 izolatının kontrolü ile ajan uygulanan izolatlarının *atl* gen ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, sanguinarine uygulanan izolatın gen ekspresyonunda %7 oranında bir azalma gözlemlendi. Askorbik asit uygulanan izolatın gen ekspresyonunda yaklaşık %43 oranında azalma gözlemlendi. Sanguinarine ve askorbik asitin kombine

uygulandığı *atl* gen ekspresyon seviyesinde ise kontrole göre, yaklaşık %21 azalma gözlemlendi (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. MSSA3 izolatında *Atl* geni ekspresyon analizi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

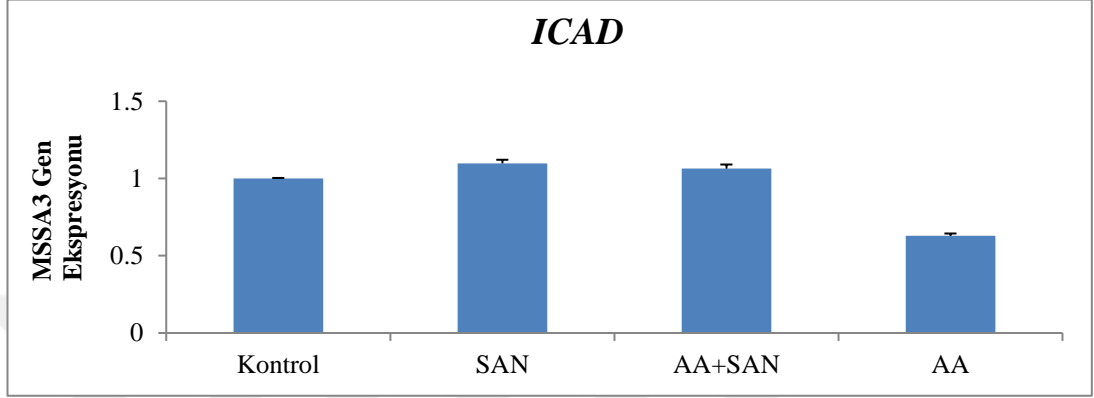
MSSA3 izolatının kontrolü ile ajan uygulanan izolatlarının *icaA* gen ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, sanguinarine ile uygulanan izolatta 1,16 kat artış gözlemlendi. Askorbik asit uygulanan izolatın gen ekspresyonunda yaklaşık %13 oranında azalma gözlemlendi. Sanguinarine ve askorbik asitin kombine uygulandığı *icaA* gen ekspresyon seviyesinde, kontrole göre 1,27 kat artış gözlemlendi (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. MSSA3 izolatında *IcaA* geni ekspresyon analizi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

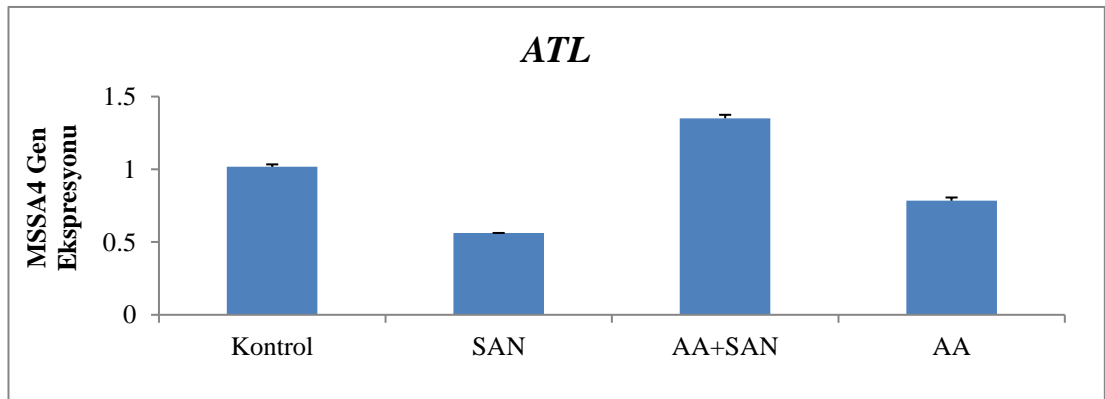
MSSA3 izolatının kontrolü ile ajan uygulanan izolatlarının *icaD* gen ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, sanguinarine uygulanan izolatın gen ekspresyonunda 1,09 kat artış gözlemlendi. Askorbik asit uygulanan izolatın gen ekspresyonunda yaklaşık %38 oranında azalma gözlemlendi. Sanguinarine ve Askorbik

asitin kombine uygulandığı *icaD* gen ekspresyon seviyesinde, kontrole göre, 1,06 kat artış gözlemlendi (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. MSSA3 izolatında *IcaD* geni ekspresyon analizi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

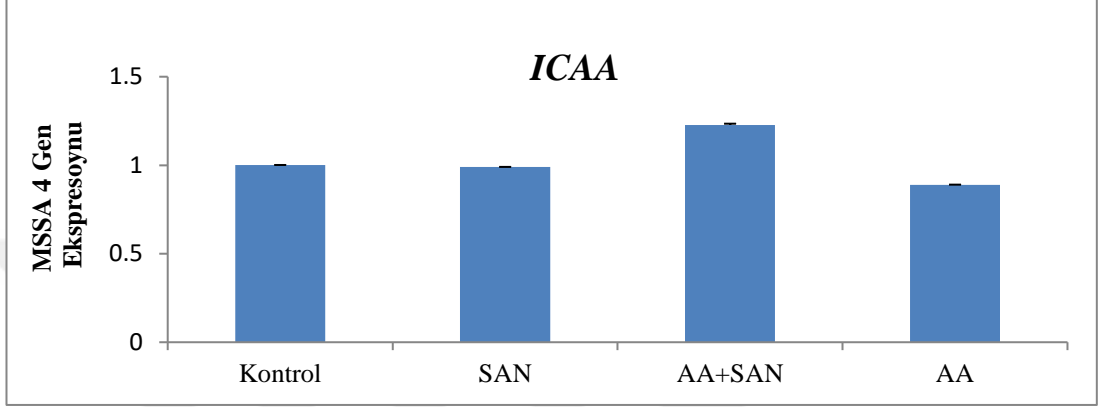
MSSA4 izolatının kontrolü ile ajan uygulanan izolatlarının *atl* gen ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, sanguinarine uygulanan izolatın gen ekspresyon seviyesinde %44 oranında bir azalma gözlemlendi. Askorbik asit uygulanan izolatın gen ekspresyonunda yaklaşık %22 oranında azalma gözlemlendi. Sanguinarine ve askorbik asitin kombine uygulandığı *atl* gen ekspresyon seviyesinde, kontrole göre, yaklaşık 1,35 kat artış gözlemlendi (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. MSSA4 izolatında *Atl* geni ekspresyon analizi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

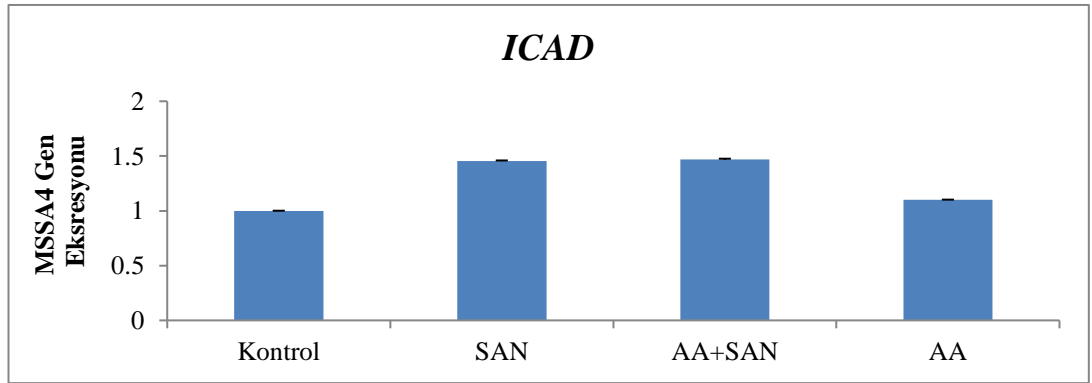
MSSA4 izolatının kontrolü ile ajan uygulanan izolatlarının *icaA* gen ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, sanguinarine uygulanan izolatın gen ekspresyonunda %1 azalma gözlemlendi. Askorbik asit uygulanan izolatın gen

ekspresyonunda %12 oranında azalma gözlemlendi. Sanguinarine ve askorbik asitin kombine uygulandığı *icaA* gen ekspresyon seviyesinde kontrole göre 1,22 kat artış gözlemlendi (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. MSSA4 izolatında *IcaA* geni ekspresyon analizi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

MSSA4 izolatının kontrolü ile ajan uygulanan izolatlarının *icaD* gen ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, sanguinarine uygulanan izolatının gen ekspresyonunda 1,45 kat artış gözlemlendi. Askorbik asit uygulanan izolatın gen ekspresyonunda 1,10 kat artış gözlemlendi. Sanguinarine ve Askorbik asitin kombine uygulandığı *icaD* gen ekspresyon seviyesinde, kontrole göre 1,46 kat artış gözlemlendi (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. MSSA4 izolatında *IcaD* geni ekspresyon analizi. AA: Askorbik Asit, SAN: Sanguinarine.

5. TARTIŞMA

S. aureus biyofilm oluşum mekanizması yeterince anlaşılamamıştır. Biyofilm oluşumu üzerinde etkili olan genler ile yapılan çalışmalar hala yetersiz ve sınırlı sayıdadır. Uzun süreli antibiyotik kullanımları bakterilerde direnç mekanizmalarının gelişmesine neden olmaktadır. Antimikrobiyal tedaviye ve immün sisteme karşı direnç gösteren biyofilm üreten bakterilerle mücadele etmek zor, hatta olanaksız olabilmektedir. Tedavisi zor ve imkansız olan biyofilm üreten *S. aureus* enfeksiyonlarının, farklı etki mekanizmalarına sahip iki farklı ajanın kombinasyonları ile tedavilerinin mümkün olabileceği düşünölmüştür. Bu ajanların kombinasyon uygulamaları ile daha düşük dozlarda ve daha etkili tedavi olanağı sağlanacağı düşünölmektedir. *S. aureus*'larda askorbik asitin biyofilm oluşumu üzerinde azaltıcı etkisinin olduğu bilinmektedir. Askorbik asitin biyofilm oluşumunu engellediği ayrıca önceden oluşmuş biyofilm yapısını yıktığı yapılan çalışmalarda görölmüştür. Çalışmamızda askorbik asit uygulaması ile yıkılan biyofilm yapısı sonucunda, sanguinarine'in hücre sitoplazmasına daha fazla difüze olduğu ve bunun sonucunda sanguinarine'in bakteri sitokinezi esnasında oluşan Z halkasının fonksiyonunu bozarak, FtsZ proteininin inhibe olup, sitokinezi inhibe ettiği düşünölmektedir (De Boer et al., 1992).

şimdiye kadar yapılmış çalışmalarda, sanguinarine ile askorbik asit kombinasyonunun *S. aureus*'lar üzerindeki etkinliğinin araştırılmadığı görölmüştür. Sadece *S. aureus*'lar üzerinde yapılan tek askorbik asit uygulama çalışması ve mayalar üzerinde tek sanguinarine uygulama çalışmasının olduğu görölmektedir. Sanguinarine'in yüksek konsantrasyonlarda memeli hücreleri için toksik etki yapabileceği düşünölmüştür. Ökaryotlarda yapılan bir çalışmada sanguinarine'in 12,8 µg/mL'de toksik etki yaptığı bildirilmiştir (Zhong et al., 2017). Çalışmamızda toksik etkisi göz önünde bulundurularak, sanguinarine'in en üst konsantrasyonu 0,128 mg/mL olacak şekilde çift kat dilüsyonları hazırlandı. Sanguinarine'nin MİK'inin tespiti için 0,128 mg/mL-0,000125 mg/mL aralığındaki konsantrasyonlar kullanıldı. Mayalarda yapılan biyofilm çalışmasında sanguinarine

için MİK değeri 1.6 µg/mL belirlenmiştir (Zhong et al., 2017). Çalışmamızda ise sanguinarine için MİK değerleri 0,008 mg/mL-0,001 mg/mL aralığında bulundu. *S. aureus*'larda yapılan bir çalışmada, askorbik asitin *S. aureus* izolatları üzerindeki MİK değerleri 4-32 µg/mL arasındaki konsantrasyonlar bulunmuştur (Ali Mirani et al., 2018). Çalışmamızda askorbik asitin *S. aureus* 'lar üzerindeki MİK'inin tespiti için 1,024 mg/mL- 0,000125 mg/mL aralığındaki konsantrasyonlar kullanıldı. *S. aureus* 'larda yapılan çalışmada askorbik asitin MİK'leri 4-32 µg/mL aralığında tespit edilmişken, çalışmamızda askorbik asitin MİK'leri 0, 256 mg/mL- 0,032 mg/mL aralığında tespit edildi (Ali Mirani et al., 2018).

Sanguinarine ve askorbik asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının, MSSA1 suşunun büyüme oranları üzerindeki etkilerine bakıldığında, 1/16 MİK sanguinarine ve 1/16 MİK askorbik asit kombinasyonları hariç ($p>0,05$), tüm alt-inhibitör kombinasyonlarının antibakteriyel aktivitesinin, sanguinarine ve askorbik asitin tek uygulamalarına göre daha etkili ($p<0,05$) olduğu gözlemlenmiştir. Sanguinarine ve askorbik asitin tek 1/16 MİK uygulamaları ve 1/16 MİK kombinasyonlarının bakteri üzerinde anlamlı antibakteriyel etkileri olduğu gözlemlenmemiştir ($p>0,05$).

Sanguinarine ve askorbik asitin, MSSA2 izolatının büyüme oranına etkilerine bakıldığında, 1/16 MİK sanguinarine ve 1/16 MİK askorbik asit kombinasyonu hariç ($p>0,05$), tüm alt-inhibitör konsantrasyonlarındaki sanguinarine ve askorbik asit kombinasyonlarının antibakteriyel aktivitesinin, sanguinarine ve askorbik asitin tek uygulamalarına göre daha fazla logaritmik azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir.

Sanguinarine ve askorbik asitin, MSSA3 izolatının büyüme oranına etkilerine bakıldığında, MİK sanguinarine ile MİK askorbik asit kombinasyonu ve 1/2 MİK sanguinarine ile 1/2 MİK askorbik asit kombinasyonu bakterisidal etki gösterirken, 1/4 MİK sanguinarine ile 1/4 MİK askorbik asit kombinasyonunun sanguinarine ve askorbik asitin tek 1/4 MİK uygulamalarına göre daha etkili olduğu görülmüştür.

1/16 MİK tek ve kombinasyon uygulamalarının antibakteriyel etkisinin olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Sanguinarine ve askorbik asitin MSSA4 izolatının büyüme oranına etkilerine bakıldığında, MİK sanguinarine ile askorbik asit kombinasyonu ve 1/2 MİK sanguinarine ile 1/2 MİK askorbik asit kombinasyonu bakterisidal etki göstermiştir. 1/4 MİK sanguinarine ile 1/4 MİK askorbik asit kombinasyonu ve 1/8 MİK sanguinarine ile 1/8 MİK askorbik asit kombinasyonunun, sanguinarine ve askorbik asitin tek uygulamalarına göre daha etkili olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). 1/16 MİK tek uygulamaları ve kombinasyonlarının anlamsız logoritmik azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir ($p > 0,05$).

Sanguinarine ile askorbik asitin kombinasyon uygulamaları sonucunda, çalıştığımızda, 3 MSSA klinik izolatının ve 1 kontrol suşunun biyofilm ve biyofilm üretiminden sorumlu *ica* lokusunda yer alan *icaA*, *icaD* ve *atl* genlerinin ekspresyon düzeylerine ve ajanların bu izolatlar üzerindeki MBEK'larına bakıldı.

MSSA1 suşunda MBEK deneyinde 1/4 MİK sanguinarine ile 1/4 MİK askorbik asit kombinasyon uygulamasının, tek ajan uygulamalarına göre biyofilmi daha fazla yıktığı gözlemlenmiştir. 1/4 MİK sanguinarine ile 1/4 MİK askorbik asit kombinasyonu uygulamasında, MSSA1 suşunun *icaA*, *icaD*, *atl* genlerinin, tek ajan uygulamalarına göre daha fazla baskılandığı gözlemlenmiştir. MBEK deneyinden elde edilen bu sonuçlarla, gen ekspresyon sonuçları birbirini desteklemektedir.

MSSA2 izolatında MBEK deneyinde, 1/4 MİK sanguinarine ve 1/4 MİK askorbik asit kombinasyonunun, tek ajan uygulamalarına göre biyofilmde daha fazla düşüşe neden olduğu gözlemlenmiştir. 1/4 MİK sanguinarine ile 1/4 MİK askorbik asit kombinasyonu uygulamasında MSSA2 izolatının *icaA*, *icaD*, *atl* genlerinin ekspresyonlarında tek ajan uygulamalarına göre daha fazla azalma olduğu gözlemlenmiştir.

MSSA3 izolatında MBEK deneyinde, 1/4 MİK sanguinarine ve 1/4 MİK askorbik asit kombinasyonunun, tek ajan uygulamalarına göre biyofilmde daha fazla azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir.

MSSA3 izolatının *atl* gen ekspresyonunda, 1/4 MİK sanguinarine ve 1/4 MİK askorbik asit kombinasyon uygulamasının, tek ajan uygulamalarına göre daha fazla düşüş gösterdiği gözlemlenmiştir. 1/4 MİK sanguinarine ve 1/4 MİK askorbik asit

kombinasyonu uygulandığında, bakteri kontrolüne göre *icaA* ve *icaD* gen ekspresyonlarında bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir.

MSSA4 izolatında MBEK deneyinde, 1/4 MİK sanguinarine ve 1/4 MİK askorbik asit kombinasyonunun, tek ajan uygulamalarına göre biyofilmde daha fazla düşüşe neden olduğu gözlemlenmiştir. 1/4 MİK sanguinarine ile 1/4 MİK askorbik asit kombinasyon uygulamasında, MSSA4 izolatının *icaA*, *icaD*, *atl* genlerinde tek ajan uygulamalarına göre ciddi olmayan, kısmi bir artış gösterdiği gözlemlenmiştir. İzolatların virulans faktörleri, antibiyotikler gibi bazı ajanların alt-inhibitör konsantrasyonları tarafından artırılabilir (Kırmusaoğlu, 2019).

Askorbik asit, PIA üretimini inhibe ederek, askorbik asite maruz kalan izolatların *icaA* gen ekspresyon düzeylerinde azalma gerçekleştiği belirtilmiştir. (Ali Mirani et al., 2018). Çalışmamızda ise askorbik asit MSSA2 izolatı hariç diğer izolatların *icaA* gen ekspresyon seviyelerini, kontrole göre düşürdüğü görülmüştür. MSSA2 izolatının *icaA* gen ekspresyon seviyesinde ciddi olmayan kısmi bir artış görülmekle birlikte MtP ve MBEK deneyine göre ise MSSA2 izolatının biyofilm üretimi ve olgun biyofilmi askorbik asit tarafından eradike ve inhibe edilmiştir. Sanguinarine uygulanmış izolatlarda, sanguinarine'in *icaA* gen ekspresyonunu azalttığı gözlemlenmiştir. Yapılan bu çalışma sanguinarine ve askorbik asitin tek ve kombine kullanımlarının *S. aureus* izolatlarının biyofilm oluşumunu inhibe edici özellik gösterdiği ve biyofilmde rol alan genler üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Deasitile olan ve β (1-6) bağı ile bağlanan N-asetil glukozamin homopolimeri olan PIA, membran proteini N-asetilglukozamin transferaz *icaA* tarafından sentezlenir. N-asetilglukozamin transferaz *icaA*'nın aktivitesi, hücre membran proteini *icaD* tarafından yapılır (Otto, 2009). Çalışmamızda sanguinarine ile askorbik asitin kombine uygulamalarında MSSA4 izolatı dışındaki izolatların *icaD*, *icaA* gen ifadelerinde azalma gözlemlenmiştir.

MSSA4 izolatının *icaA* ve *icaD* genlerinin ekspresyon seviyelerinde ciddi olmayan kısmi bir artış görülmekle birlikte, MtP ve MBEK deneylerine göre ise MSSA4 izolatının biyofilm üretimi ve olgun biyofilmi sanguinarine ile askorbik asitin kombinasyonu tarafından azaltılmıştır. İzolatların virulans faktörleri, antibiyotikler

gibi bazı ajanların alt-inhibitör konsantrasyonları tarafından artırılabilir (Kırmusaoğlu, 2019).



6. SONUÇLAR

S. aureus'lar hastane enfeksiyonlarında biyofilm oluşturan en sık görülen patojen bakterilerdir. Biyofilm oluşturan *S. aureus*'lar antibiyotik ve birçok antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gösterirler. Biyofilme ve sürekli antibiyotik kullanımına bağlı olarak bakterilerin direnç kazanmaları sonucunda, uygulanan tedavilere olumlu yanıt alınamamaktadır. Bu durum araştırmacıları yeni antibakteriyel tedavi yöntemleri araştırmaya sevk etmiştir.

Hem planktonik hem de sesil evrelerdeki *S. aureus*'ların inhibisyonunda, sanguinarine ve askorbik asit gibi doğal bileşenlerin alt-inhibitör konsantrasyonlarının yeterli olduğu görülmüştür. Sanguinarine ile askorbik asitin tek ve kombinasyon uygulamalarının, biyofilm üretimini ve biyofilme gömülü bakterileri inhibe etmesinin yanı sıra, biyofilm ilişkili genlerin ifadelerinde azalışa neden olduğu görülmüştür. Çalışmanın sonuçlarına göre, sanguinarine ile askorbik asit kombinasyonları, ica-bağımlı biyofilm üreten *S. aureus* izolatlarının bu ajanların tek uygulamalarına karşı duyarlılıklarını artırarak, alternatif bir tedavi opsiyonu olabilir. Ayrıca ileri ki çalışmalarda, bu ajan kombinasyonlarının, ica-bağımsız biyofilm üreten *S. aureus* izolatları üzerindeki etkilerine de bakılabileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Ahsan H, Reagan-Shaw S, Breur J, Ahmad N. (2007) Sanguinarine induces apoptosis of human pancreatic carcinoma AsPC-1 and BxPC-3 cells via modulations in Bcl-2 family proteins. *Cancer Lett.*, 249(2):198–208. doi10.1016/j.canlet.2006.08.018.
- Ali Mirani Z, Khan MN, Siddiqui A, Khan F, Aziz M, Naz S, Ahmed A, Khan SI. (2018) Ascorbic acid augments colony spreading by reducing biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Iran J Basic Med Sci*, 21(2): 175–180.
- Amábile-Cuevas CF, Piña-Zentella R, Wah-Laborde ME. (1991) Decreased resistance to antibiotics and plasmid loss in plasmid-carrying strains of *Staphylococcus aureus* treated with ascorbic acid. *Mutat Res.*, 264(3): 119-25.
- Amábile-Cuevas CF, Heinemann JA. (2004) Shooting the messenger of antibiotic resistance: plasmid elimination as a potential counter-evolutionary tactic. *Drug Discovery Today*, 9(11): 465-7.
- Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. (2000) Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.*, 44(7):1818-24.
- Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. (2011) *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation and roles in human disease. *Virulence*, 2(5): 445–59. doi: 10.4161/viru.2.5.17724.
- Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. (2015) Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol.*, 5: 7. doi: 10.3389/fcimb.2015.00007.
- Atshan SS, Shamsudin MN, Lung LT, Ling KH, Sekawi Z, Pei C, Ghaznavi-Rad E. (2012). Improved method for the isolation of RNA from bacteria refractory to disruption, including *S. aureus* producing biofilm. *Gene*, 494(2):219-24. doi:10.1016/j.gene.2011.12.010.
- Atshan SS, Shamsudin MN, Karunaidhi A, van Belkum A, Lung LT, Sekawi Z, Nathan JJ, Ling KH, Seng JS, Ali AM, Abduljaleel SA, Hamat RA. (2013) Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm development of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Infect Genet and Evol.*, 18: 106-12. doi: 10.1016/j.meegid.2013.05.002.
- Beuria TK, Santra MK, Panda D. (2005) Sanguinarine blocks cytokinesis in bacteria by inhibiting FtsZ assembly and bundling. *Biochemistry*, 44(50):16584-93.
- Baddour LM, Epstein AE, Erickson CC, Knight BP, Levison ME, Lockhart PB, Masoudi FA, Okum EJ, Wilson WR, Beerman LB. (2010) Update on cardiovascular implantable electronic device infections and their management: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 121(3): 458-77.
- Bjarnsholt T, Moser C, Jensen PO, Hoiby N. (eds) (2011) *Biofilm Infections*. Springer Science Business Media, New York Dordrecht Heidelberg London, p: 215–225.

- Bose JL, Lehman MK, Fey PD, Bayles KW. (2012) Contribution of the *Staphylococcus aureus* Atl AM and GL murein hydrolase activities in cell division, autolysis, and biofilm formation. *Plos One*, 7(7): e 42244.
- Chambers HF, DeLeo, FR. (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol.*, 7 (9): 629–41. doi.org/10.1038/nrmicro2200.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6): 996-1006.
- CLSI. (2013) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document M100-S123.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418): 1318–22.
- Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. (1999) The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun.*, 67(10): 5427-5433.
- Darouiche RO. (2004) Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med.*, 350: 1422-9.
- Davies D. (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.*, 2(2): 114–22. doi: 10.1038/nrd1008.
- De Boer P, Crossley R, Rothfield A. (1992). The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature*, 359(6392): 254-6.
- Donlan RM, Costerton JW. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.*, 15(2): 167–93.
- Erickson HP, Anderson DE, Osawa M. (2010) FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 74: 504-528.
- Flemming HC and Wingender J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.*, (9): 623-33. doi: 10.1038/nrmicro2415.
- Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK Höök M. (2014) Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol.*, 12(1): 49-62.
- Fowler VG, Scheld WM, Bayer AS. (2015) Endocarditis and intravascular infections. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 8th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, p: 990-1028.
- Gottenbos B, van der Mei HC, Busscher HJ. (2000) Initial adhesion and surface growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on biomedical polymers. *J Biomed Mater Res.*, 50(2): 208–14.

Gu S, Yang XC, Xiang XY, Wu Y, Zhang Y, Yan XY, Xue YN, Sun LK, Shao GG. (2015) Sanguinarine-induced apoptosis in lung adenocarcinoma cells is dependent on reactive oxygen species production and endoplasmic reticulum stress. *Oncology Reports*, 34(2): 913–9.

Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, Moreillon P, de Jesus Antunes M, Thilen U, Lekakis J. (2009) Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the task force on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. *Eur Heart J.*, 30: 2369-413.

Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D. and Götz F. (1996) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol.*, 20(5): 1083–91.

Hetrick EM, Schoenfisch MH. (2006) Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chem Soc Rev.*, 35(9): 780-9.

Hou Z, Yang R, Zhang C, Zhu LF, Miao F, Yang XJ, Zhou L. (2013) 2-(Substituted phenyl)-3,4-dihydroisoquinolin-2-iums as novel antifungal lead compounds: biological evaluation and structure-activity relationships. *Molecules*, 18(9): 10413–24. doi:10.3390/molecules180910413.

Jan-Roblero J, Rodríguez-Martínez S, Díaz ME, Cancino-Díaz JC. (2016) *Staphylococcus* Biofilms. In *Microbial Biofilms- Importance and Applications*. IntechOpen, London, p: 212-230.

Joo HS, Otto M. (2012) Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem Biol.*, 19(12): 1503–13. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.10.022.

Kaplan JB. (2010) Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res.*, 89(3): 205–18.

Kırmusaoglu S. (2016) *Staphylococcal Biofilms: Pathogenicity, Mechanism and Regulation of Biofilm Formation By Quorum-Sensing System and Antibiotic Resistance Mechanisms of Biofilm-Embedded Microorganisms*. In: *Microbial Biofilms Importance and Applications*. Eds: Dhanasekaran D, Thajuddin N. Intech, Croatia, p: 189–209. doi:10.5772/61499.

Kırmusaoglu S. (2017) MRSA and MSSA: The Mechanism of Methicillin Resistance and The Influence of Methicillin Resistance on Biofilm Phenotype of *Staphylococcus aureus*. In: *The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus*. Eds: Enany S, Alexander LE. Intech, Croatia, p: 25–41. doi.org/10.5772/65452.

Kırmusaoglu S. (2019) The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. In: *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*. Ed: Kırmusaoglu S. IntechOpen, London, p: 99-115. ISBN: 978-1-78985-790-0. doi: 10.5772/intechopen.84411.

- Kuroda M, Ito R, Tanaka Y, Yao M, Matoba K, Saito S, Tanaka I, Ohta T. (2008) *Staphylococcus aureus* surface protein SasG contributes to intercellular autoaggregation of *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 377(4):1102–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.10.134.
- Lebeaux D, Ghigo JM. (2012) Infections associées aux biofilms Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale? *Synthèse revues. médecine/sciences*, 28: 727-39.
- Lewandowski, Z, Beyanal H. (2013) *Introduction to Biofilms and to Biofilm Research* 2 th ed. CRC PressTaylor & Francis Group, NW: CRC.
- Licitra, G. (2013) Etymologia: *Staphylococcus*. *Emerg. Infect. Dis.*, 19(9): 1553. doi: 10.3201/eid1909.ET1909.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)). *Methods*, 25(4): 402-408.
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.*, 15(2): 194-222. doi:10.1128/cmr.15.2.194-222.2002.
- Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R. (1996) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol.*, 178(1): 175–83.
- Marrie TJ, Nelligan J, Costerton JW. (1982) A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation*, 66(6): 1339-41.
- Mingorance J, Rivas G, Vélez M, Gómez-Puertas P, Vicente M. (2010) Strong FtsZ is with the force: mechanisms to constrict bacteria. *Trends Microbiol.*, 18(8): 348–56.
- Moody J. (2004) Susceptibility tests to evaluate synergism. In: Isenberg H.D., editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press; Washington DC, pp. 5.12.1–5.12.23.
- Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. (2008) Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Plos Pathog.*, 4(11): e1000213.
- NCCLS. (1999) Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agent; approved guideline. Wayne PA, NCCLS, NCCLS document M26-A.
- O’Gara JP, Humphreys H. (2001) *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J. Med. Microbiol.*, 50(7): 582–7.
- O’Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA Loughman A, Foster TJ, O’Gara JP. (2008) A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J Bacteriol.*, 190(11): 3835–50.

- Otto M. (2008) Staphylococcal biofilms. In: (ed), *Bacterial Biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Ed: Romeo T. Springer Berlin Heidelberg, p:207-228.
- Otto M. (2009) *Staphylococcus epidermidis*-the 'accidental pathogen. *Nat Rev Microbiol.*, 7(8): 555-567. doi: 10.1038/nrmicro2182.
- Otto M. (2013) a Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation. *Annu Rev Med.*, 64:175–188.
- Otto M. (2013) b Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection: staphylococcal commensal species such as *Staphylococcus epidermidis* are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence. *Bioessays*. 35: 4–11. doi: 10.1002/bies.201200112.
- Plata K, Rosato AE and Wegrzyn G. (2009) *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochim Pol.*, 56(4): 597–612.
- Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W. (2000) Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 44(12): 3357–63.
- Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS, Bayles KW. (2007) The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104(19):8113–8.
- Rodrigues LR. (2011) Inhibition of bacterial adhesion on medical devices. *Adv Exp Med Biol.*, 715: 351-67. doi: 10.1007/978-94-007-0940-9_22.
- Romberg L, Levin PA. (2003) Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FtsZ: Poised at the edge of stability. *Annu Rev Microbiol.*, 57: 125-54.
- Rosenbach, AJ. (1884) *Mikro-Organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen*. J.F. Bergmann, Wiesbaden, p:18.
- Russell AD. (1990) Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *J Appl Bacteriol.*, 71(3): 191–201.
- Saginur R, Stdenis M, Ferris W, Aaron SD, Chan F, Lee C, Ramotar K. (2006) Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. In *Antimicrob Agents Chemother*, 50(1): 55–61.
- Shoeb HA, Al-Shora HI, Abdel-Salam T. (1995), Ascorbate as an induction inhibitor of beta-lactamase in a strain of *Enterobacter cloacae*. *Lett Appl Microbiol.*, 21(6): 398-401.
- Speziale P, Pietrocola G, Foster TJ, Geoghegan JA. (2014) Protein-based biofilm matrices in Staphylococci. *Front Cell Infect Microbiol.*, 4:171.

Spormann AM. (2008) Physiology of microbes in biofilms. In: Bacterial Biofilms. Ed: Romeo T. Springer–Verlag Berlin Heidelberg, 322: 17–36.

Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GD, Djukić S, Ćirković I, 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(8): 891-9.

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. Annu Rev Microbiol., 56: 187–209.

Tajkarimi M, Ibrahim SA. (2011) Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* O157: H7 in laboratory medium and carrot juice. Food Control, 22(6): 801-804.

Vacheethasanee K, Temenoff JS, Higashi JM, Gary A, Anderson JM, Bayston R, Marchant RE. (1998) Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene, J Biomed Mater Res., 42(3): 425–32.

Wei W, Yang H, Hu L, Ye Y, Li J. (2017) Activity of levofloxacin in combination with colistin against *Acinetobacter baumannii*: In vitro and in a *Galleria mellonella* model. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 50(6): 821-830.

Vuong C, Otto M. (2002) *Staphylococcus epidermidis* infections. Microbes and Infection, 4(4): 481-9.

Zhong H, Hu DD, Hu GH, Su J, Bi S, Zhang ZE, Wang Z, Zhang RL, Xu Z, Jiang YY, Wang Y. (2017) Activity of Sanguinarine against *Candida albicans* Biofilms. Antimicrob Agents Chemother., 61(5) pii: e02259-16.

8. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında İstanbul'da doğdu. İlk ve ortaokul eğitimini Gürpınar Azime Yılmaz ilk öğretim okulunda tamamladı. Lise eğitimini Bahçeşehir Atatürk Süper Lisesi'nde 1998-2002 yılları arasında tamamladı. Lisans eğitimini Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde 2003-2007 yılları arasında tamamladı. 2010-2013 yılları arasında Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde biyolog olarak çalıştı. 2015-2016 yılları arasında Farmamag Ambalaj İlaç. Aş' de Mikrobiyoloji Sorumlusu olarak çalıştı. 2016 yılından itibaren Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında biyolog olarak çalışmaktadır.

YAYINLAR:

Irmak Yazıcıoğlu MB, Ceylaner B, Turna S, **Kaşıkcı H.** (2018) Kanserde hedefe yönelik monoklonal antikor tedavisi. Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 1:95-102

Kart Yaşar K, Kehribar A, **Kaşıkcı H.**, Cebeci N, Pehlivanoğlu F, Şengöz G, Kumbasar Karaosmanoğlu H. (2013) HIV/AIDS Hastalarına ait HIV RNA sonuçlarının analizi. Med Bull Haseki 2014;52(2):80-83. DOI: 10.4274/Haseki.1251