



**T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**MRSA ETKENLİ YARA ENFEKSİYONLARINDA YENİ TEDAVİ
STRATEJİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Burçin ÇİV
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nizami DURAN**

HATAY – 2021

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

MRSA ETKENLİ YARA ENFEKSİYONLARINDA YENİ TEDAVİ
STRATEJİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Burçin ÇİV
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Nizami DURAN

Bu tez, HATAY Mustafa Kemal Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 20.U.012 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MRSA ETKENLİ YARA ENFEKSİYONLARINDA YENİ TEDAVİ STRATEJİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Burçin ÇİV

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

(İmza).....
Prof. Dr. Yusuf ÖNLEN
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

(İmza).....
Prof. Dr. Nizami DURAN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

(İmza).....
Prof. Dr. Nizami DURAN
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

- 1.Prof. Dr. Nizami DURAN.....
- 2.Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
- 3.Prof. Dr. Tekin KARSLIGİL.....

III.İÇİNDEKİLER

III. İÇİNDEKİLER.....	III
IV. TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	VI
V. RESİM LİSTESİ	VIII
VI. KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	XI
VII. TEŞEKKÜR.....	XIV
VIII. ÖZET	XV
IX. ABSTRACT	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.1.1. Kolonizasyon	7
2.1.2. Virülans	8
2.1.3. <i>S. aureus</i> Adezinleri	9
2.1.4. Toksinler	9
2.2. Stafilkoklarda Biyofilm Oluşumu ve Tıbbi Önemi	11
2.2.1 Metisiline Duyarlı <i>S. aureus</i> Tarafından Biyofilm Oluşumu	12
2.2.2 Metisiline Dirençli <i>S. aureus</i> Tarafından Biyofilm Oluşumu.	13
2.2.3. Metisilin Direnci Biyofilm Fenotipi ve Virülansı Nasıl İlişkisi	14
2.3.. Enfeksiyon Oluşumu	15
2.3.1. Sistemik Enfeksiyon.....	17
2.4. Sessiz Salgınlar: Yaralar.	18
2.4.1. Yaraların Prevelansı.	19
2.5. Yara İyileşmesinin Aşamaları.....	19
2.5.1 Enflamasyon Fazı.	20
2.5.2. Proliferasyon Fazı.....	22
2.5.3. Matürasyon Fazı.	23
2.6 Kapsaisin	23
2.6.1. Kapsaisin'in biyoaktivitesi, farmakolojik etkileri ve mekanizmaları. .	25
2.7. Nisin	26

2.8. Kumarin.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Araç ve Gereçler	29
3.2. Kimyasal maddeler	30
3.2.1. RPMI-1640 Besiyeri	30
3.2.2. Versen-Tripsin Solüsyonunun Hazırlanması	31
3.2.3. PBS hazırlanması.....	31
3.3. Tripan Mavisini ile Hücre Canlılığı Tayini.....	31
3.4. Stok Solüsyonların Hazırlanması.	31
3.4.1.Kumarin Solüsyonu	31
3.4.2.Kapsaisin Solüsyonu	32
3.4.3.Nisin Solüsyonu.....	32
3.4.4.Mupirosin Solüsyonu	32
3.5.Kongo Kırmızısı Besiyerinin Hazırlanması	32
3.6.Çalışmada Kullanılan Suşlar	33
3.7. Hücre Kültürü ve Kimyasal Bileşikler	33
3.7.1.Hücre Canlılık Tayini.....	34
3.7.2.Aktivite Çalışmaları	35
3.8. Vero Hücre Hattında Kapsaisin, Nisin ve Kumarin Varlığında <i>S. aureus</i> Üremesinin İncelenmesi	36
3.9. Kapsaisin, Nisin ve Kumarin'in <i>S. aureus</i> 'un Hücre Adezyonu ve İnvazyonu Üzerindeki Etkinliklerinin Değerlendirilmesi.	37
3.9.1. İnvazyon Deneyi.....	38
3.10. Slime Üretimi	38
3.11. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	39
3.11.1. RNA Ekstraksiyonu.....	39
3.11.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	39
3.12. RT-qPCR Deneyleri.	40
3.13. Deney Hayvanları Çalışmaları.....	41
3.13.1. Çalışma Grupları	41
3.13.2 Tedavi.....	43
3.13.3. Tedavi Sonrası Doku Örneklerinin Değerlendirilmesi.....	43

3.13.4. Histolojik Değerlendirmeler	43
3.14. İstatistiksel analiz.	43
4. BULGULAR	44
4.1. DMSO/Etanol'ün Non-Toksik Konsantrasyonunun Belirlenmesi	44
4.2. MTT Sonuçları.....	49
4.3. Nisin, Kapsaisin, Kumarin'in <i>S. aureus</i> 'a Karşı Antibakteriyel Etkinliklerinin Değerlendirilmesi	52
4.4. Nisin, Kapsaisin, Kumarin'in <i>S.aureus</i> 'un Biyofilm Üretme Özelliğine Etkisi	58
4.5. Nisin, Kapsaisin, Kumarin'in <i>S.aureus</i> 'un Hücre Adezyon ve İnvazyonuna Etkisi.	60
4.6. Real-Time PCR Sonuçları.....	64
4.7. Dokuların Histopatolojik Değerlendirilmesi.....	69
5. TARTIŞMA.....	78
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	91
7. KAYNAKLAR.....	94
8. EKLER.....	117
9. ÖZGEÇMİŞ.....	118

IV. TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan oligonükleotit dizileri ve baz büyüklükleri	40
Tablo 2. Deney grupları	42
Şekil 1. DMSO'nun Vero hücre hattında non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.....	44
Şekil 2. Etanol'ün Vero hücre hattında non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi	45
Şekil 3. Mupirosin'in Vero hücre kültüründe non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.....	50
Şekil 4. Nisin'in Vero hücre kültüründe non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi	51
Şekil 5. Kapsaisin'in Vero hücre kültüründe non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi	51
Şekil 6. Kumarin'in Vero hücre kültüründe non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.....	51
Şekil 7. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in <i>S. aureus</i> 'a karşı antibakteriyel etkinliği ..	52
Şekil 8. <i>S. aureus</i> 'a karşı Nisin'in etkinliğinin Mupirosin ile kıyaslanması	54
Şekil 9. Kapsaisin'in <i>S. aureus</i> 'a karşı Mupirosin ile etkinliğinin kıyaslanması	55
Şekil 10. Kumarin'in <i>S. aureus</i> 'a karşı Mupirosin ile etkinliğinin kıyaslanması	55
Şekil 11. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in <i>S. aureus</i> 'a karşı Mupirosin ile kombine etkinliklerinin değerlendirilmesi	56
Şekil 12. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in <i>S. aureus</i> 'a karşı Mupirosin ile kombine etkinliklerinin değerlendirilmesi	57
Şekil 13. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in <i>S. aureus</i> 'un slime oluşturma kapasitesi üzerindeki etkinliklerinin karşılaştırılması	58
Şekil 14. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in Vero hücrelerine adezyon sonuçlarının Mupirosin grubuyla kıyaslanması	60
Şekil 15. Nisin, Kapsaisin, Kumarin ve farklı kombinasyonlarının <i>S. aureus</i> 'un hücre adezyonu üzerindeki etkilerinin Mupirosin ile kıyaslanması	61

Şekil 16. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in Vero hücrelerine invazyon sonuçlarının Mupirosin ve kontrol grubuyla kıyaslanması	62
Şekil 17. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin ve farklı kombinasyonlarının <i>S. aureus</i> 'un hücre invazyonu üzerindeki etkinlikleri	63
Şekil 18. Kapsaisin, Nisin ve Kumarin'in <i>mecA</i> ve <i>blaZ</i> geni ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkinlikleri	69



V. RESİM LİSTESİ

Resim 1. MSSA ve MRSA’da biyofilm oluşumu.....	14
Resim 2. <i>Staphylococcus aureus</i> enfeksiyonunun aşamaları	16
Resim 3. Enflamatuar Faz	21
Resim 4. Makrofajın yaradaki rolü	21
Resim 5. Yaralanma sonrası kollajen miktarı ve gerilim kuvvetinin zaman ile ilişkisi	22
Resim 6. Farelerde deneysel olarak oluşturulan MRSA enfekte yara dokusu	42
Resim 7. Vero Hücreleri. A. 96 saat inkübasyondan sonra içerisinde DMSO bulunmayan hücre kültürünün mikroskopik görüntüsü. B: içerisinde $\leq$ %2 DMSO bulunan hücre kültürünün morfolojik görünümü	46
Resim 8. Vero Hücreleri. A. 96 saat inkübasyondan sonra içerisinde %70 etanol bulunmayan hücre kültürünün mikroskopik görüntüsü. B: içerisinde $\leq$ %3 etanol (%70’lik) bulunan hücre kültürünün morfolojik görünümü	46
Resim 9. Vero hücreleri üzerinde inkübasyonun 96.saatinde Kumarin’in farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde etkisi	47
Resim 10. Vero hücreleri üzerinde inkübasyonun 96.saatinde Nisin’in farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde etkisi.....	48
Resim 11. Vero hücreleri üzerinde inkübasyonun 96.saatinde Kapsaisin’in farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde etkisi.....	49
Resim 12. Nisin’in <i>S. aureus</i> ’un büyüme inhibisyonunu gösteren ekim, 1/100 dilüsyon	53
Resim 13. Kapsaisin’in <i>S. aureus</i> ’un büyüme inhibisyonunu gösteren ekim, 1/1000 dilüsyon	53
Resim 14. Kumarin’in <i>S. aureus</i> ’un büyüme inhibisyonunu gösteren ekim, 1/1000 dilüsyon	53
Resim 15. Kontrol grubu, 1/1000 dilüsyon	53
Resim 16. Mupirosin’in <i>S. aureus</i> ’a karşı antibakteriyel etkinliği, 1/1000 dilüsyon	53
Resim 17. Nisin’in biyofilm üzerindeki etkisi	59

Resim 18. Kapsaisin'in biyofilm üzerine etkisi	59
Resim 19. Kumarin'in biyofilm üzerindeki etkisi	59
Resim 20. Kontrol suşun biyofilm özelliği	59
Resim 21. Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin kombinasyonunun biyofilm üzerindeki etkisi	59
Resim 22. Kumarin artı Nisin artı Mupirosin kombinasyonunun biyofilm üzerindeki etkisi	59
Resim 23. İzole edilen total RNA'nın agaroz jelde görüntüsü.	64
Resim 24. Nisin'in Real-Time PCR amplifikasyonu ve “melting curve” grafiği. ...	65
Resim 25. Kumarin'in Real-Time PCR amplifikasyonu ve “melting curve” grafiği.	65
Resim 26. Kapsaisin'in Real-Time PCR amplifikasyonu ve “melting curve” grafiği.	66
Resim 27. Mupirosin'in Real-Time PCR amplifikasyonu ve “melting curve” grafiği.	66
Resim 28. <i>mecA</i> Real-Time PCR amplifikasyonu ve “melting curve” grafiği.	67
Resim 29. <i>blaZ</i> Real-Time PCR amplifikasyonu ve “melting curve” grafiği.	67
Resim 30. <i>16S rRNA</i> Real-Time PCR amplifikasyonu ve “melting curve” grafiği. .	68
Resim 31. Pozitif kontrol Real-Time PCR amplifikasyonu ve “melting curve” grafiği.	68
Resim 32. Nisin tedavi grubu. Normal histolojik yapıda deri dokusu	71
Resim 33. Kumarin artı Mupirosin tedavi grubu. Normal histolojik yapıda deri dokusu	72
Resim 34. Kapsaisin artı Mupirosin tedavi grubu. Normal histolojik yapıda deri dokusu	72
Resim 35. Kapsaisin tedavi grubu. Kollajen birikimi (ok), ödem(yıldız).	73
Resim 36. Kumarin tedavi grubu. Ödem (yıldızlar), mononükleer hücre infiltrasyonu(oklar),	73
Resim 37. Kumarin tedavi grubu. Reepitelizasyon(ok),	73
Resim 38. Nisin artı Mupirosin tedavi grubu. Ödem ve mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldızlar), kollajen birikimi (oklar),	74

Resim 39. Kapsaisin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubu. Reepitelizasyon(oklar), kollajen birikimi, mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldızlar),	74
Resim 40. Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubu. Damarlaşma (yıldızlar) kolajen birikimi (oklar),	75
Resim 41. Kapsaisin artı Kumarin artı Mupirosin tedavi grubu. Reepitelizasyon(ok), mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem, yangı (yıldız),.....	75
Resim 42. Kapsaisin artı Kumarin artı Mupirosin tedavi grubu. Reepitelizasyon (ok), mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem, yangı (yıldız),	75
Resim 43. Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubu. Mononükleer hücre infiltrasyonu(yıldız), reepitelizasyon(ok),	76
Resim 44. Mupirosin tedavi grubu. Damarlaşma (yıldız),.....	76
Resim 45. Mupirosin tedavi grubu. Kanama (yıldızlar), mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar),	76
Resim 46. Kontrol grubu. Kanama (oklar), ödem(yıldızlar),	77
Resim 47. Kontrol grubu. Damarlaşma (yıldızlar)	77

VI. KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

- ABD:** Amerika Birleşik Devletleri
ACME: Arginin Katabolik Mobil Elementi
ADP: Adenozin difosfat
agr: Aksesuar Gen Düzenleyici
APC: Antijen Sunan Hücre
AP-1: Aktivatör Protein-1
ATCC: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
Bap: Biyofilm ile İlişkili Protein
bFGF: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
BHI: Beyin-Kalp-İnfüzyon
°C: Santigrat Derece
CAE: Cerrahi Alan Enfeksiyonları
CA-MRSA: Toplum Kaynaklı MRSA
Ccr: Kaset Kromozom Rekombinaz
CHIPS: *S. aureus*'un kemotaksi inhibitör proteini
ClfB: Kümelenme faktörü B
Cna: Kollajen Adezin
DFU: Diyabetik Ayak Ülserleri
DHFA: Dihidrofolik Asit;
Dk: Dakika
Dmso: Dimetil Sülfoksit
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
Eap: Ekstraselüler Adherens Proteini
Ecb: Ekstrasellüler Kompleman Bağlayıcı Protein
ECM: Ekstrasellüler Matriks
Efb: Fibrinojen Bağlayıcı Protein
EMRSA: Salgın MRSA
FLIPr: FPRL1 inhibitör proteini

FnBP: Fibronektin bağlayıcı proteinler
Gr: Gram
HA-MRSA: Sağlık Bakımıyla İlişkili MRSA
HeR: Düşük Düzeyde Heterojen Direnç
HoR: Yüksek Düzeyde Homojen Direnç
hVISA: Heterojen VISA
KGF: Keratinosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
LA-MRSA: Hayvancılıkla İlgili MRSA
Lt: Litre
M: Molar
MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MALDI-TOF MS: Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon-İyonizasyon Uçuş Süresi
Kütle Spektrometrisi
MAMP: Mikroorganizma ile İlişkili Moleküler Patern
MAPK: Mitojen-Aktivasyonlu Protein Kinaz
µg: Mikrogram
mg: Miligram
MİK; Minimum inhibitör konsantrasyon
ml: Mililitre
mM: Milimolar
MRSA: Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*
MSCRAMM: Yapışkan Matriks Molekülleri
MSSA: Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus*
NaCl: Sodyum Klorür
PABA: para-aminobenzoik asit
PBP2a: Penisilin Bağlayıcı Protein 2a
PBS: Fosfat Tuz Solüsyonu
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF: Derive Kaynaklı Büyüme Faktörü
PIA: Hücreler Arası Polisakkarit Adezin
PMN: Polimorfonükleer Lökosit
PNAG: poli-N-asetilglukozamin

PSM: Fenolde Çözünür Modülün
PTS_{Ag}: Pirojenik Toksin Süperantijenleri
PVL: Panton-Valentine lökositidin
Rpm: Revolutions per minute
SAK: Stafilokinaz THFA: Tetrahidrofolik Asit
SCC_{mec}: Stafilokokal Kaset Kromozomu *mec*
SCIN: Stafilokok Kompleman İnhibitörü
SEA: Enterotoksin tip A
SEIX: Stafilokokal Enterotoksin Benzeri X
SSI: Cerrahi Alan Enfeksiyonu
SSL7: Stafilokokal Süperantijen Benzeri Protein 7
SSSS: Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu
SSTI: Cilt ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları
TGF- β : Transforme Büyüme Faktörü- beta
TLR2: Toll benzeri reseptör 2
TRPV1: Geçici reseptör potansiyeli vanilloid iyon kanalı reseptörü-1
TSST1: Toksik Şok Sendromu Toksini 1
VEGF: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
VISA: Vankomisine Orta Dirençli *S. aureus*
VLU: Venöz Bacak Ülseri
VRSA: Vankomisine Dirençli *S. aureus*
WGS: tüm gen sekansı
w/v: Ağırlık/Hacim

VII. TEŞEKKÜR

Asistanlık sürecinde ve tez çalışmalarım boyunca bana destek ve özverisini esirgemeyen, her türlü bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, zorlandığım zamanlarda beni yönlendiren ve yardımcı olan değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Nizami DURAN’a,

Asistanlık eğitimim süresince bana her türlü desteği veren, bilgi ve deneyimlerini paylaşan Sayın Prof. Dr. Burçin ÖZER’e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Sayın Emrah AY, Funda ÇİMEN, Erhan TEK ve Suphi BAYRAKTAR’a teşekkür ederim.

MKÜ Merkez Laboratuvarında beraber mesai paylaştığım Covid-19 pandemisinin sessiz kahramanları tüm laboratuvar çalışanlarına,

Özellikle manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Merve ERDEM UYSAL, Dr.Sezin ÇOLAK HALLUM, Hayat ASLAN MULLAOĞLU, İpek YILMAZ, Süreyya EZER ve Sema ARSLAN’a

Uzmanlık eğitimim süresi boyunca birbirimize destek olup sırt sırta verdiğimiz Dr. Muhammed Emirhan KARAMAN’a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her şartta yanımda olan, üstümde sonsuz emekleri ve fedakarlıkları bulunan değerli annem ve babama minnettarlarımı sunarım.

Her koşulda yanımda olduğunu gösteren, desteklerini esirgemeyen ve büyük sabırla asistanlık sürecime ortak olan sevgili eşim Sedat ÇİV ve nazlı kızım İnci Nas ÇİV’e sonsuz teşekkürler ...

Dr. Burçin ÇİV

Hatay / 2021

VIII. ÖZET

MRSA ETKENLİ YARA ENFEKSİYONLARINDA YENİ TEDAVİ STRATEJİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu çalışmada Nisin, Kumarin ve Kapsaisin'in *in-vitro* ve *in-vivo* olarak MRSA'ya karşı etkinliğinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla *in-vitro* deneylerde bu biyolojik komponentlerin hücre adezyonu ve invazyonu, canlılık, biyofilm oluşturma kapasitesi ve *mecA* ve *blaZ* ilaç direnç genlerinin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkinlikleri değerlendirildi. Çalışmada farelerde deneysel olarak oluşturulan MRSA ile enfekte yaralarda bu bileşiklerin ve farklı kombinasyonlarının yara iyileşmesi üzerindeki etkinlikleri de araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem: Deneylerde öncelikle Nisin, Kumarin ve Kapsaisin'in Vero hücre hattında MTT yöntemiyle non-sitotoksik konsantrasyonları tespit edildi. Etkinlik çalışmaları non-sitotoksik konsantrasyonlar dahilinde gerçekleştirildi. Bu üç biyolojik komponentin tekli ve farklı kombinasyonlarının hücre adezyonu ve invazyonu üzerindeki etkinlikleri, biyofilm üretimi üzerindeki rolü ve RT-PCR yöntemiyle de *blaZ* ve *mecA* gen ekspresyonu üzerindeki etkinlikleri değerlendirildi. Ayrıca yara iyileşmesi üzerindeki etkinlikleri histopatolojik değerlendirmelerle gerçekleştirildi.

Bulgular: Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in non-toksik konsantrasyonları sırasıyla 15.6µg/ml, ≤50 µg/ml, ve ≤0.65 mg/ml olarak tespit edildi. En güçlü antibakteriyel etkinlik sırasıyla Nisin, Kumarin ve Kapsaisin tedavi gruplarında tespit edildi. Nisin'in anti-MRSA etkinliği Mupirosin'in etkinliği ile kıyaslandığında anlamlı derecede daha yüksek bulundu (p=0.042). Nisin artı Mupirosin kombine kullanımının anti-MRSA aktivitesi tekli Mupirosin kullanımından anlamlı derecede daha yüksekti (p=0.046). Kapsaisin artı Mupirosin, Kumarin artı Mupirosin tedavi gruplarının etkinliği tekli Mupirosin'in etkinliğinden anlamlı derecede yüksek idi (p=0.049). En güçlü etkinliğin Nisin artı Kapsaisin artı Kumarin artı Mupirosin kombinasyonu ile elde edildi (p=0.046). Kumarin artı Nisin artı Mupirosin ve Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin kombinasyonlarının mikroorganizmanın slime üretimi üzerinden etkili olduğu, anlamlı düzeyde slime oluşumunu inhibe ettiği saptandı (p<0.01). Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubunda bakterinin hücre adezyonu üzerindeki etkinliği en güçlü düzeyde saptanırken, Nisin artı Mupirosin, Kapsaisin artı Nisin artı Mupirosin, Kumarin artı Nisin artı Mupirosin ve Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi gruplarında hücresel invazyonun Mupirosinle

kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Nisin, Kumarin ve Kapsaisin'in hem *mecA* hem de *blaZ* gen ekspresyonu üzerindeki etkinlikleri kontrol grubuyla kıyaslandığında ekspresyon seviyeleri daha düşük, etkinlik anlamlı derecede daha yüksek idi. Ayrıca Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubunda yara iyileşmesinin Mupirosin tedavi grubuyla kıyaslandığında antimikrobiyal etkinliğin daha güçlü, yara iyileşmenin daha hızlı olduğu tespit edildi.

Sonuç: Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in birbirleriyle ve Mupirosinle farklı kombinasyonlarının MRSA'ya karşı güçlü etkinlikler ve sinerjiler oluşturduğu tespit edildi. Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin kombinasyonunun *S.aureus*'un hem ilaç direncinin hem de slime üretimine karşı güçlü bir etkinlik sergilediği oldukça önemli bir alternatif olabileceğini düşünmekteyiz. Bu komponentlerin ve kombinasyonlarının ilaç direncine bağlı tüm dünyada artan morbidite ve mortaliteye karşı önemli alternatif seçenekler olarak kullanılabileceği kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: Nisin, Kapsaisin, Kumarin, enfeksiyon, yara, Mupirosin, sinerjistik etki.

IX. ABSTRACT

INVESTIGATION OF NEW TREATMENT STRATEGIES IN WOUND INFECTIONS CAUSED BY MRSA

Purpose: In the study, the effectiveness of Nisin, Coumarin and Capsaicin against MRSA was investigated in-vitro and in-vivo. For this purpose, the efficacy of these biological components on cell adhesion and invasion, viability, biofilm forming capacity and expression levels of “*mecA*” and “*blaZ*” drug resistance genes against *S.aureus* in-vitro conditions were evaluated. The efficacy of these compounds and their different combinations on wound healing in experimentally induced MRSA-infected wounds in mice was investigated.

Materials and Methods: First of all, non-cytotoxic concentrations of Nisin, Coumarin and Capsaicin were determined in Vero cell line by MTT method. Efficacy studies were performed within these determined non-cytotoxic concentrations. The efficacy of single and different combinations of these three biological components on cell adhesion and invasion, their role in biofilm production, and their efficacy on the expression levels of “*blaZ*” and “*mecA*” genes were evaluated by RT-PCR method. In addition, the efficacy of these components on wound healing was performed by histopathological evaluations.

Results: The non-toxic concentrations of Nisin, Capsaicin and Coumarin were 15.6µg/ml, ≤50 µg/ml, and ≤0.65 mg/ml, respectively. The strongest antibacterial activity was detected in the Nisin, Coumarin and Capsaicin treatment groups, respectively. The anti-MRSA activity of Nisin was found to be significantly higher compared to Mupirocin ($p=0.042$). The anti-MRSA activity of the Nisin plus Mupirocin combination was significantly higher than that of Mupirocin ($p=0.046$). The efficacy of Capsaicin plus Mupirocin, Coumarin plus Mupirocin treatment groups was significantly higher than the efficacy of Mupirocin ($p=0.049$). The strongest efficacy was obtained with the combination of Nisin plus Capsaicin plus Coumarin plus Mupirocin ($p=0.046$). Coumarin plus Nisin plus Mupirocin and Capsaicin plus Coumarin plus Nisin plus Mupirocin combinations were effective on slime production of the microorganism, inhibiting slime formation significantly ($p<0.01$). In the Capsaicin plus Coumarin plus Nisin plus Mupirocin treatment group, the effect of bacteria on cell adhesion was determined to be the strongest. In the Nisin plus Mupirocin, Capsaicin plus Nisin plus Mupirocin, Coumarin plus Nisin plus Mupirocin, and Capsaicin plus Coumarin plus Nisin plus Mupirocin treatment groups, cellular

invasion was significantly higher compared to Mupirocin ($p < 0.05$). Nisin, Coumarin and Capsaicin were found to be significantly lower than the control group in inhibition of both “*mecA*” and “*blaZ*” gene expressions. In addition, wound healing in the Capsaicin plus Coumarin plus Nisin plus Mupirocin treatment group was found to be stronger and wound healing faster, when compared to the Mupirocin group.

Conclusion: Different combinations of Nisin, Capsaicin and Coumarin with each other and with Mupirocin developed strong efficacy and synergies against MRSA. The combination of Capsaicin plus Coumarin plus Nisin plus Mupirocin showed strong efficacy against both drug resistance and the slime production of *S.aureus*. We think that this formulation can be a very important alternative in treatment. These components and combinations may be important alternative options against increasing morbidity and mortality all over the world due to drug resistance.

Key words: Nisin, Capsaicin, Coumarin, infection, wound, mupirocin, synergistic effect.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Staphylococcus aureus (*S.aureus*) Gram-pozitif, hareketsiz, koagülaz pozitif kokoid formda bir bakteridir. *S. aureus* genel nüfusun %20-40'ında insan kommensal nazal mukoza mikrobiyotasında bulunur (1, 2). *S.aureus* kökenlerinde ilaç direnci ciddi bir halk sağlığı sorunu olup, her geçen gün artan ilaç direnci özellikle de metisilin dirençli kökenlerin ortaya çıkmasından bu yana sorun daha önemli boyutlara ulaşmıştır. Yaklaşık 60 yıldır metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatlarının varlığı bilinmektedir. MRSA ortaya çıktığı ilk günden bugüne kadar tüm dünyada birçok hastalığın etiyolojisinde rol oynayan çok önemli morbidite ve mortalite etkeni haline gelmiştir. Son yıllarda *S.aureus* tüm dünyada hem hastane hem de toplum kökenli bakteriyel enfeksiyonların en önemli sebeplerinden biri olarak gösterilmektedir (3). Stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde hücre duvarı sentezi, nükleik asit sentezi ve protein sentezinin inhibisyonunda rol oynayan β -laktam (penisilnaz dirençli) grubu ilaçlar, Vankomisin, Teikoplanin gibi antibiyotikler kullanılabilir. Bununla birlikte, metisilin dirençli stafilokokların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi giderek artan bir sorun haline gelmektedir. Antibiyotik direnci, hedef hücre değişikliği, enzimatik inaktivasyon, artan eflüks pompası ve ilaç geçirgenliğinde değişiklik (4) gibi çeşitli farklı mekanizmalarla ortaya çıkmakta ve direncin yayılmasında çok sayıda mobil genetik eleman (5) rol oynayabilmektedir.

Penisiline dirençli *S. aureus* izolatları, bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için penisilinin verilmesinden kısa bir süre sonra ortaya çıkmış ve ortalama 20 yıl içerisinde, suşların yaklaşık %80'i beta-laktamaz enzimini kodlayan *blaZ* geninin kazanılmasıyla kritik beta-laktam halkasının hidrolizasyonu ile dirençli hale gelmiştir (6, 7). Bu direnç geni (*blaZ*) transpoze edilebilir kromozoma entegre olabilen, diğer antibiyotik direnç genlerinden farklı olarak civa ve diğer ağır metallere direnç gösteren büyük konjugatif plazmidler üzerinde bulunan bir genetik elemandır (8-11). Günümüzde klinik *S. aureus* suşlarının % 99'u penisiline dirençlidir (12).

MRSA suşları çoğu beta-laktam antibiyotik için düşük afiniteli alternatif bir transpeptidaz olan PBP2a'yı kodlayan *mecA* geninin horizontal olarak kazanılması yoluyla metisiline dirençli olup aynı zamanda geniş beta-laktam sınıfının hemen

hemen tüm üyelerine de dirençlidir (12). Antibiyotik direnci dünya çapında artan ciddi bir tehlikedir. Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde önemli sorunlara neden olmaktadır. Geleneksel antibiyotiklerin klinik etkinliğini büyük ölçüde zayıflatan bu sorunun giderilmesi için yeni ilaçların keşfi ve geliştirilmesi gerekmektedir (13). Bu amaçla çeşitli doğal ve sentetik aktif molekül arayışları devam etmektedir. Bitkisel ya da mikrobiyal metabolik ürünler özellikle sağlıklı hücreler üzerindeki düşük toksisiteyi nedeniyle dikkat çeken farmakolojik ürünler arasında yer almaktadır.

Bu doğal metabolik ekstrelerden biri Nisin'dir. Nisin, *Lactococcus lactis* tarafından üretilen bir bakteriyosin olup önemli patojenlere (*Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus* ve *Bacillus*) karşı etkinliği bildirilmiş bir doğal üründür. Hatta Nisin'in antisporosidal etkilerinin de olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında immun-modülatör olarak da işlev yaptığı bildirilmiş ve kanser hücrelerine karşı selektif sitotoksositeye sahip olduğu gösterilmiştir (14). Çalışmalar Nisin'in diğer antibiyotiklerle kombinasyonunun Gram-negatif patojenlere karşı etkili olabileceğini ve bazı biyomühendislik çalışmaları sonucu üretilen Nisin türevlerinin hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif patojenlere karşı aktivitesini arttırabildiğini göstermiştir (15). Ayrıca biyoteknolojideki son gelişmelerle birlikte araştırmacılar, yeni Nisin türevlerinin insan enfeksiyonları için terapötik potansiyele sahip olduğunu bildirmişlerdir (16, 17).

Doğal ürünler arasında Kumarin de farmakolojik özellikleri bakımından oldukça potent bir üründür. Kumarin 1820'de ilk izole edildiği kaynaklardan biri olan Tonka fasulyesi, coumarou, *Dipteryx odorata* (*Coumarouna odorata*) tohumları (Fabaceae/Leguminosae) olduğu için Fransızca bir terimden gelmektedir. Kokusu, yeni biçilmiş ot kokusunu andırmakta olup bu nedenle kozmetik sanayinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Yenilmesini caydırmak için bitkiler tarafından kimyasal bir savunma olarak üretildiği düşünülmektedir (18). Yapısının basitliği ve çok yönlülüğü Kumarin'i çeşitli uygulamalar için cazip hale getirmektedir (19, 20). Kumarin'in ekstraksiyonu sentezi ve değerlendirilmesi oldukça dikkat çekici ve hızla gelişen bir konu haline gelmiştir (21,22). Ayrıca çeşitli farmakolojik aktiviteleri, düşük toksisitesi ve düşük yan etkileri, düşük ilaç direnci, yüksek biyoyararlanımı, geniş spektrumu, daha iyi küratif etkisi olması gibi özellikleri nedeniyle ilaçlar için aday olarak çok sayıda Kumarin bileşiği aktif olarak incelenmektedir (23). Antikoagülan, antioksidan,

antimikrobiyal (anti-viral, antifungal ve anti-paraziter), antikanser, anti-diyabetik, analjezik, antinörodejeneratif ve anti-inflamatuar ajanların geliştirilmesi için Kumarin'in etkinliği ile ilgili çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. Ayrıca, kendine has ve oksijen içeren heterosiklik yapısı Kumarin bileşiklerinin tıbbi kimyada önemli bir yer tutmasını sağlamaktadır (24). Tıbbi ilaçlar olarak Kumarin bileşikleri hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki temel katkıları nedeniyle giderek daha fazla ilgi çekmektedir (22).

Geniş farmakolojik etkilerinden dolayı en dikkat çekici bitkisel aktif bileşenlerden biri de Kapsaisin'dir. Kapsaisin (8-metil-N-vanilil-6-nonenamid), capsicum türü bitkilerde (chili peppers) bulunan aktif bir bileşen olup biberlerin neden olduğu "yanma" hissinden sorumlu maddedir. Kapsaisin'in halk tıbbında yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Geçmişte Kapsaisin'in ameliyat edilecek hastalarda anestezi ve analjezik madde olarak dahi kullanıldığı bildirilmiştir. Karakteristik yapısı nedeniyle özellikle son yıllarda Kapsaisin'in antimikrobiyal etkinliği ile ilgili çeşitli çalışmalara da rastlamak mümkündür (25).

Biz bu çalışmada bitkisel kaynaklı fitokimyasallar olan Kumarin ve Kapsaisin ile mikroorganizma metabolik ürünlerinden Nisin'in tekli ve kombine kullanımlarının;

- Metisilin dirençli *S.aureus* kökenlerinin hücre adezyonu ve invazyonu üzerindeki etkinliklerini,
- Bu biyolojik komponentlerin Mupirosin ile sinerjik aktivitelerini,
- *MecA* ve *blaZ* ilaç direnç genlerinin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkinliklerini,
- Mikroorganizmanın slime (biofilm) üretimi üzerindeki etkinliklerini,
- Deneysel olarak oluşturulmuş MRSA ile enfekte yaralarda bu biyolojik komponentlerin ve farklı kombinasyonlarının yara enfeksiyonları üzerindeki etkinliklerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, gram pozitif, hareketsiz, koagülaz pozitif, kokoid, Firmicutes filumundan bir bakteridir. *Staphylococcus* cinsi 52 tür ve 28 alt tür (Adlandırmadaki Prokaryotik İsimlerin Listesi) içermesine rağmen, *S. aureus* klinikle en çok ilişkilendirilendir. *S. aureus* genel popülasyonun %20-40'ında nazal mukozanın insan kommensal mikrobiyotasında bulunur (2, 26). Bildirilen prevelanstaki değişkenlik, çalışmadaki popülasyonun boyutu ve demografik özellikleri, örnek kalitesi ve kullanılan kültür teknikleri arasındaki farklılıklara bağlıdır (27). Kronik cilt rahatsızlıkları, yara veya cerrahi operasyon nedeniyle kutanöz ve mukozal bariyerler bozulduğunda, *S. aureus* derin dokulara veya kan dolaşımına erişebilir ve enfeksiyona neden olabilir. İnvaziv tıbbi aletli (periferik ve santral venöz kateterler gibi) veya bağışıklık sistemi zayıf olan kişiler *S. aureus* enfeksiyonuna karşı özellikle savunmasızdır (28).

Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA), ilk olarak 1961'de İngiltere'de, metisilin klinik uygulamaya girdikten kısa bir süre sonra tanımlanmıştır. Metisilin başlangıçta yaygın olarak kullanılmıştır; ancak, toksisitesi nedeniyle artık insan kullanımı sınırlıdır ve yerini oksasilin, flukloksasilin ve dikloksasilin gibi benzer, daha kararlı penisilinler almıştır (29). Yine de metisiline dirençli *S. aureus* terimi kullanılmaya devam etmektedir. Tanımını izleyen ilk on yılda, MRSA dünyanın birçok yerinde hastane salgınlarından (sağlık bakımıyla ilişkili MRSA (HA-MRSA)) sorumlu hale gelmiştir (10). Daha önce sağlık hizmeti ile teması olmayan kişilerde (toplum kaynaklı MRSA (CA-MRSA) olarak adlandırılır) özellikle 1980'lerde Avustralya'daki (30) yerli nüfus ve 1990'larda Amerika Birleşik Devletleri'ndeki çocuklar da dahil olmak üzere sağlıklı kişilerde (31) MRSA epidemiyolojisinde önemli bir değişiklik gözlenmiştir. 2000'li yılların ortalarından bu yana, aynı zamanda çiftlik hayvanlarına maruziyet ile de ilişkilendirilmiştir (Hayvancılıkla ilişkili MRSA (LA-MRSA)) (32).

mecA veya *mecC* genlerini kodlayan, metisilin ve dolayısıyla çoğu β -laktam antibiyotiğe direnç kazandıran mobil bir genetik element stafilokokal kaset

kromozomu *mec* (*SCCmec*) dir (33). MRSA sıklıkla diğer birçok antibiyotik sınıfına da dirençlidir. Gerçekten de *S. aureus*, herhangi bir antibiyotiğe direnç kazanma konusunda dikkate değer bir yeteneğe sahip olup bu patojen için mevcut ve gelecekteki tedavi seçenekleri için önemli bir tehdittir (10).

MRSA kolonizasyonu veya taşıyıcılığı (yani, saptanabilir bir konakçı bağışıklık yanıtına, hücresel hasara veya enfeksiyonun klinik belirti ve semptomlarına neden olmayan bakterilerin varlığı) olan bireylerde enfeksiyon gelişme riski mevcut olup taşıyıcılar kişiden kişiye bulaş kaynağıdır. Sağlık tesisleri enfeksiyona yatkın kişileri barındırmaktadır. Özellikle hastaneler antibiyotik kullanımının yüksek olduğu alanlar olup kişiler arasında sık temasın olduğu ortamlardır. Bu koşullar hastanelerde MRSA'nın salgın olarak yayılmasını kolaylaştırmaktadır. MRSA halen dünyada birçok sağlık tesisinde endemik olup global enfeksiyon kontrol komitelerinin odak noktası haline gelmiştir.

HA-MRSA

HA-MRSA hastanede yatan hastalarda bakteriyemi, pnömoni ve daha az yaygın olarak SSTI'lerin (özellikle cerrahi yaralar veya vasküler erişim bölgelerindeki invaziv prosedürlerle ilgili) bir nedenidir (34). Organizma genellikle, biyofilm oluşturma ve hayatta kalma kapasitesi nedeniyle intravasküler kateterler, endotrakeal tüpler ve idrar sondaları gibi invaziv cihazlarla ilişkilidir (35). Uzun süre hastanede yatan, yoğun bakım ünitesine kabul edilen, bakım evinde ikamet eden, antibiyotik maruziyeti (özellikle sefalosporinler ve florokinolonlara, önde gelen antibiyotik seçim baskısına kadar), cerrahi, hemodiyaliz, kronik yaralar veya kalıcı invaziv cihazlar, HA-MRSA ile enfeksiyon riskinde artışa sebep olmaktadır (36).

CA-MRSA

Toplum kökenli MRSA için en yaygın klinik, sıklıkla apse veya irin oluşumu ile görülen ve vakaların ~%90'ını oluşturan yara enfeksiyonlarıdır (37). CA-MRSA özellikle virülan enfeksiyonlara neden olabilir. Nekrotizan pnömoni ve nekrotizan fasiit (deri altı dokuların sekonder nekrozu ile fasyanın hızla ilerleyen enfeksiyonu) gibi CA-MRSA suşları ile fulminan enfeksiyonlar bildirilmiştir. CA-MRSA suşları ile gözlenen virülans artışı için en önemli sebep, Agr sistemleri ve PVL (Panton-Valentine lökositidin) üretiminin olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte, PVL'nin varlığı suştan suşa değiştiğinden, bu duruma diğer virülans faktörlerinin de katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (10). CA-MRSA enfeksiyonu olan bireyler genellikle HA-MRSA suşları ile ilişkili risk faktörlerinden yoksundur. CA-MRSA enfeksiyonu salgılarının rapor edildiği popülasyonlar veya ortamlar arasında spor takımları, askeri personel ve hapishaneler gibi alanlar olarak bildirilmektedir (38, 39). MRSA taşıyıcılarıyla yakın temas (evlerde veya diğer ortak yaşam ortamlarında), paylaşılan ekipman veya kişisel eşyalar ve cilt travması (enjekte ederek uyuşturucu kullanımı veya vücut traşından kaynaklanan travma dahil) artan CA-MRSA enfeksiyonu riskiyle ilişkilendirilebilir. Bununla birlikte, CA-MRSA yükünün yüksek olduğu bazı ülkelerde, CA-MRSA suşlarının bulaşmasının sağlık bakım ortamlarında gözlemlenmesiyle birlikte, CA-MRSA ve HA-MRSA arasındaki ayrım giderek karmaşıklaşmaktadır (40).

LA-MRSA (Livestock-associated methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*)

LA-MRSA, apseler ve yara enfeksiyonları dahil, otit gibi lokalize enfeksiyonların yanı sıra bakteriyemi, pnömoni, osteoartiküler enfeksiyonlar ve endokardit gibi ciddi ve invaziv enfeksiyonlarla ilişkilendirilmektedir (41). LA-MRSA, ağırlıklı olarak çiftlik hayvanları (sığır, at, tavuk ve hindiler dahil ancak özellikle domuzlar dahil) ile doğrudan teması olan bireyleri ve hane içinde bulaşarak hane üyelerini kolonize ve enfekte etmektedir (42). Ancak, hayvancılıkla bağlantısı olmayan bireylerde de LA-MRSA bildirimleri vardır, bu vakaların çevresel

kontaminasyon yoluyla yayıldığı veya daha az yaygın olarak da gıda kaynaklı bulaşma olduğu varsayılmaktadır (42).

2.1.1. Kolonizasyon

S. aureus kolonizasyonu çoğu durumda enfeksiyon gelişiminden önce gelir (43). Nadiren de olsa enfeksiyon, kolonizasyon oluşmadan da ortaya çıkabilmektedir. Örneğin sağlık çalışanlarının yetersiz enfeksiyon kontrol uygulamaları nedeniyle kateterlerin veya yaraların kontaminasyonunun bir sonucu olarak enfeksiyon gelişebilir. *S. aureus* kolonizasyonunun başlıca yeri burundur, ancak boğaz ve perine gibi diğer bölgelerde de kolonizasyon meydana gelebilir (44). Çalışmalarda *S.aureus*'un (hem MSSA hem de MRSA dahil) geçici üç kolonizasyon paterninin olduğu bildirilmektedir (45). Bireylerin ~%15'inde (kalıcı taşıyıcılar) sürekli, %70'inde intermitten *S. aureus* kolonizasyonu (bu bireylerin çoğunluğunun tekrar tekrar *S. aureus* kapabileceği ve spontan olarak temizlenebileceği anlamına gelir), ve %15'inin de *S. aureus* taşıyıcısı olmadığı bildirilmiştir (45). Taşıyıcılık durumunun konağa ait faktörlere bağlı olduğu bildirilmiştir. Özellikle MRSA için kolonizasyon süresi değişken olup antibiyotik tedavisine göre süre değişmektedir. Konak faktörlerinin yanı sıra, patojenin kendisi ve nazal mikrobiyota ile ilişkili faktörler, konakçı taşıyıcı durumunu etkileyebilmektedir.

S. aureus kolonizasyonu sırasında, konakçının epitel hücrelerine ilk bakteri adezyonuna hücre duvarındaki teikoik asit aracılık eder, oysa adeziv matriks moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri, nazal kolonizasyonun daha sonraki bir aşamasında rol oynamaktadır (46). *S. aureus* kümelenme faktör B (ClfB) ile ilgili çeşitli in-vitro ve insan gönüllülerinde çalışmalar yapılmış vahşi suş ve tek lokus *clfB* hasarlı varyantı burna inoküle edildiğinde hasarlı varyantın vahşi suştan önemli derecede daha hızlı temizlendiği tespit edilmiştir. Bu çalışma mikrobiyal yüzey bileşenlerinin mikrobiyal kolonizasyonda önemli olduğunu göstermektedir.

Konak ve patojen faktörlerinin yanı sıra, *S. aureus*'un nazal kanalada diğer kolonize türlerle (örneğin, *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium acnes* *Staphylococcus lugdunensis* ve *Staphylococcus epidermidis*) etkileşiminin de *S.aureus* kolonizasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir. Nazal mikrobiyota çalışmaları, bazı

türlerin varlığının *S. aureus*'un varlığı veya yokluğu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (örneğin, *S. epidermidis*, *S. aureus*'un varlığı ile pozitif olarak ilişkilendirilmiştir) (47). Nazal mikrobiyotanın mikroorganizmaları birbirleriyle rekabet halindedir. Örneğin, adezyon alanları ve besinler için rekabet hat safhadadır. İnsan burnunda düşük miktarda besin mevcuttur. *S. aureus*, muhtemelen metabolizma farklılıkları nedeniyle, koagülaz negatif stafilokoklardan daha düşük besin seviyelerine sahip ortamlarda hayatta kalabildiğinden (48) insan burnuna daha kolay adaptasyon gösterebilmektedir. Bununla birlikte, taşıyıcılar ve taşıyıcı olmayanlar arasında besin düzeylerinde bir fark gözlenmemiştir (48).

Mikrobiyota türleri ayrıca antibiyoz ile yani mikrobiyal rakiplerini engelleyen antimikrobiyal moleküller üreten bazı suşlarla da rekabet eder. Örneğin *S. lugdunensis*, muhtemelen bakteriyel enerji kaynaklarının bozulmasına yol açan in-vitro ve bir fare modelinde *S. aureus*'u (MRSA dahil) inhibe eden *lugdunin* adlı bir antimikrobiyal bileşik üretir (49). İnsanlarda, *S. lugdunensis* ile nazal kolonizasyon, *S. aureus* ile kolonizasyon riskinin altı kat daha düşük olması ile ilişkilendirilmiştir. *S. lugdunensis* kolonizasyonu genel popülasyonun yalnızca %9-26'sında rapor edildiğinden, taşıyıcılık modellerinin yalnızca küçük bir kısmını açıklamaktadır (49, 50). *S. aureus* konak savunmasının uyarılmasıyla da rekabet eder, yani *S. aureus*'a diğer kommensal bakterilerden daha az zararlı olan konakçı antimikrobiyal proteinlerin üretimini de indüklediği bildirilmiştir (51).

2.1.2. Virülans

S. aureus, çeşitli virülans faktörlerine (adeziv, konak hücreye zarar veren ve immünomodülatör moleküller dahil) sahip olup değişen virülans faktörlerin varlığı veya özgüllükleri (52, 53) enfeksiyon çeşitliliğini yansıtmaktadır (54, 55) Mobil genetik elementler üzerinde birçok virülans geni bulunur; bu nedenle, bunların kombinasyonları klonlar arasında ve hatta yakından ilişkili suşlar arasında büyük ölçüde farklılık gösterir.

2.1.3. *S. aureus* Adezinleri

S. aureus'un kolonizasyon sürecini başlatan konakçı hücre yüzeyine bağlanmasına birkaç adezin aracılık eder. *S. aureus* adhezinlerinin majör sınıflarından biri, hücre peptidoglikanlarına kovalent olarak bağlanmış proteinleri içerir. Bu proteinler plazma veya hücre dışı matriks (ECM) bileşenlerine spesifik olarak bağlanan ve yapışkan matriks moleküllerini (MSCRAMM'ler) tanıyan, mikrobiyal yüzey bileşeni olarak adlandırılırlar (56-58). Bu moleküller, fibrinojen, fibronektin ve kollajenler dahil olmak üzere ECM'nin veya kan plazmasının en belirgin bileşenlerini tanıır (28, 59-61). MSCRAMM ailesinin tipik üyeleri stafilokokal protein A (SpA), fibronektin bağlayıcı proteinler A ve B (FnbpA ve FnbpB), kollajen bağlayıcı protein ve kümelenme faktörü (Clf) A ve B proteinleridir (28, 56).

2.1.4. Toksinler

S. aureus α -toksin, β -toksin ve PVL, pnömoni ve akciğer hasarında önemli bir rol oynar. Hem α -toksin hem de PVL, proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu indükleyerek ve ek inflamatuvar mediatörleri serbest bırakarak konakçı inflamatuvar yanıtını arttıran porlar oluştururlar. Bu nedenle, bu toksinlerin akciğer hasarına yol açmak için hem doğrudan hem de dolaylı yolları vardır (62, 63). Bununla birlikte, bu toksinlerin *S. aureus*'un neden olduğu pnömoni ve akciğer hasarındaki önemi hakkında çok az şey bilinmektedir.

α -Toksin

S. aureus tarafından salınan başlıca sitotoksik ajandır ve por oluşturucu olarak tanımlanan ilk bakteriyel ekzotoksindir. Duyarlı konak hücre zarlarında por oluşumu, iyon gradyanlarındaki değişiklikleri, membran bütünlüğünün kaybını, stres sinyal yollarının aktivasyonunu ve hücre ölümünü tetikler (64). *S. aureus* α -toksininin stafilokok hastalıklarının patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. *hla* içermeyen *S. aureus* mutantları ile oluşturulan invaziv hastalık modellerinde virülansın azaldığı

bildirilmiştir (65). α -toksin, konakçı hücrelerde bir glikoprotein reseptörüne bağlanarak hücre içi sinyalizasyon aktivasyonu ve çeşitli süreçlerin modülasyonu gibi biyolojik fonksiyonları da bulunmaktadır (63, 66, 67). Ayrıca α -toksinin kemokinlerin hava yoluna salgılanmasını kolaylaştırdığı ve nötrofil aracılı inflamatuvar akciğer hasarını tetiklediği bildirilmiştir (68).

β -Toksin (β -Hemolizin)

β -toksinin çoğu konak hücre tipini parçalamadığı ancak α -toksin ve PVL gibi bir dizi başka litik ajanlara karşı duyarlı hale getirdiği bildirilmektedir (69) β -toksinin sitotoksik etkisi hücre tipine ve türe özgü değişmektedir. Bu primer virülans aktivitesi konakçı hücreleri doğrudan öldürmek yerine patogenezi etkileyen konakçı süreçleri modüle etmek olarak değerlendirilmektedir (69). Bir çalışmada, *S. aureus* β -toksinin, sitotoksik aktivitesiyle değil, daha ziyade sindekan-1'e bağlı bir şekilde PMN infiltrasyonunu artırma kapasitesiyle akciğer hasarını maksimuma çıkardığı gösterilmiştir (69). Ayrıca, bu toksin, NF- κ B ve p38 MAPK sinyal kaskadları yoluyla c-Fos ekspresyonunun indüklenmesinde, henüz bilinmeyen farklı hücre sinyal yollarını aktive edebileceği düşünülmektedir (64, 70). Hem alfa hem de beta toksin nötrofil infiltrasyonunu artırma kapasitesi aracılığıyla akciğer hasarını ve inflamasyonu arttırmaktadır (68, 69). Bu nedenle, α - ve β -toksinlerin aracılık ettiği sindekan-1'in salınımının çok çeşitli akut inflamatuvar bozuklukların gelişiminde kritik bir mekanizma olabileceği düşünülmektedir.

Panton-Valentine Lökosidin

Panton-Valentine Lökosidin *S. aureus* tarafından üretilen birkaç hücre dışı sitotoksinden biridir. İlk tanımlandığı yıllarda toksinin cilt ve yumuşak doku enfeksiyonu ile ilişkili olduğu düşünülse de PVL'nin nekrotizan hastalıklarda bir virülans faktörü olduğu bilinmektedir (71).

PVL'nin hücrelerde por formasyonu oluşumunu tetiklediği bildirilmektedir (72). Ayrıca, miyeloid hücrelerin PVL'nin düşük konsantrasyonlarda apoptozu indüklerken artan konsantrasyonlarda nötrofillerin lizisine yol açtığı bildirilmiştir (73).

Por formasyonu için toksinin iki bileşeni olan LukS-PV ve LukF-PV'nin varlığı gerekmektedir. Saflaştırılmış PVL'nin sublitik konsantrasyonlarının bazofillerinden histamin salınımını indüklediği ve nötrofil enzimleri (β -glukuronidaz ve lizozim), kemotaktik bileşenleri (lökotrien-B₄ ve IL-8) ve oksijen metabolitlerinin salınımını uyardığı bildirilmektedir (74).

2.2. Stafilokoklarda Biyofilm Oluşumu ve Tıbbi Önemi

İmplant edilebilir tıbbi cihazlar modern sağlık hizmetlerinde devrim yaratırken biyofilm oluşumuna ve yabancı cisim ilişkili enfeksiyonlara yol açan yüzeye yapışan bakteriler tarafından bu yabancı cisimlere bağlanarak morbidite ve mortaliteyi önemli ölçüde etkilemektedir. Stafilokoklar yabancı cisim enfeksiyonlarının en yaygın etiyolojik ajanları arasında yer almaktadır ve biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların en sık nedeni olarak kabul edilmektedir (75). Biyofilmlerle ilişkili enfeksiyonların tedavisi zordur çünkü bakterilerin biyofilm matriksi ve fenotipik özellikleri, konakçının bağışıklık yanıtına ve antimikrobiyal direncine neden olmaktadır (76).

İnsan vücuduna implante edilen tüm tıbbi cihazlar stafilokok kolonizasyonuna karşı duyarlıdır ve stafilokokkal biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar, implante edilmiş kateterlerden protez kalp kapakçıklarına, kalp pillerine, kontakt lenslere, beyin omurilik sıvısı şantlarına, eklem replasmanlarına ve intravasküler ekipmana kadar çeşitli cihazlarla ilişkilendirilmiştir (77). Hasarlı doku biyofilmle ilişkili enfeksiyon gelişimi için bir risk faktörüdür. Normal cilt florasının bir parçası olan *S. aureus*, sözgelimi yanık veya ameliyat sonrası yaralarda derine yerleşmiş cilt enfeksiyonlarına neden olabilen fırsatçı patojenlerdir (78). Deforme kalp kapakçıklarında biyofilmler oluşturarak yaşamı tehdit eden enfektif endokarditin gelişmesine yol açtığı bilinmektedir (79).

S. aureus'un implante edilmiş tıbbi cihazlar veya hasarlı doku üzerinde biyofilm oluşturma yeteneği, bu patojen için önemli bir virülans faktördür (80).

Biyofilm oluşumunun en çok çalışılan mekanizmaları arasında *icaADBC* operon kodlu polisakkarit hücreler arası yapışma özelliği veya poli-N-asetilglukozamin (PNAG) üretimi yer almaktadır (81). *ica* operonundan bağımsız biyofilm oluşumu hem *S. epidermidis* hem de *S. aureus*'ta da tanımlanmıştır (82, 83).

2.2.1. Metisiline Duyarlı *S. aureus* Tarafından Biyofilm Oluşumu

S. aureus'taki biyofilm oluşumunun ilk açıklanan mekanizması, daha önce *S. epidermidis*'te tarif edilmiş olan PIA/PNAG üretimini içermektedir (84, 85). PIA, hücreler arası agregasyonu ve hücrelerin inert yüzeylere bağlanmasını destekleyen pozitif yüke sahip β -1,6-bağlı 2-asetamido-2-deoksi-D-glukopiranozil rezidülerinin bir glikanıdır (86).

ica operonu, *icaA*, *icaD*, *icaB* ve *icaC* olmak üzere dört biyosentez geninden ve farklı şekilde kopyalanmış bir supressor *icaR*'den oluşur (87). *ica* lokusunun aktivitesi üzerine araştırmaların çoğu *S. epidermidis*'te yapılmıştır ancak belirtilmelidir ki *S. epidermidis* ve *S. aureus*'un *ica* lokusları arasında yüksek nükleotid dizi benzerliği ve amino asit seviyesinde %78 özdeşlik bulunmaktadır (88).

Bir çalışmada *S. epidermidis*'in *ica* operonundaki bir transpozon mutasyonunun biyofilm oluşumunu ve PIA üretimini bozduğunu göstermiştir (85). Sonraki çalışmalar *S. aureus*'un ayrıca biyofilm oluşum mekanizması olarak *icaADBC* tarafından kodlanmış PIA'yı da yaygın olarak kullandığını göstermiştir (84, 88). *ica* lokusunun taşınması, çoğu klinik *S. aureus* suşunda bulunan bir özelliktir (88, 89).

PNAG'dan bağımsız *S. aureus* biyofilm üretiminin ilk raporlarından biri, biyofilm ile ilişkili protein (Bap) ile biyofilm oluşturan sığır mastiti izolatlarında tanımlanmıştır (90). İnsan *S. aureus* izolatı UAMS-1 ile yapılan bir çalışma, in-vitro ve in-vivo koşullar altında *icaADBC*'den bağımsız bir biyofilm fenotipini de ortaya çıkarmıştır (91). Biyofilm oluşumunun PIA'ya bağlı ve PIA'dan bağımsız mekanizmalarına yönelik araştırmalar, *S. aureus*'ta metisilin duyarlılığı ile biyofilm arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir (83, 92-94). β -laktam duyarlılığı ve biyofilm fenotipi arasındaki bu ilişki ilk olarak *S. epidermidis*'te, Mempel ve arkadaşları değişken PIA üretimi düzeylerinin fenotipik varyantlarda farklı β -laktam duyarlılığı düzeyleri ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (95, 96).

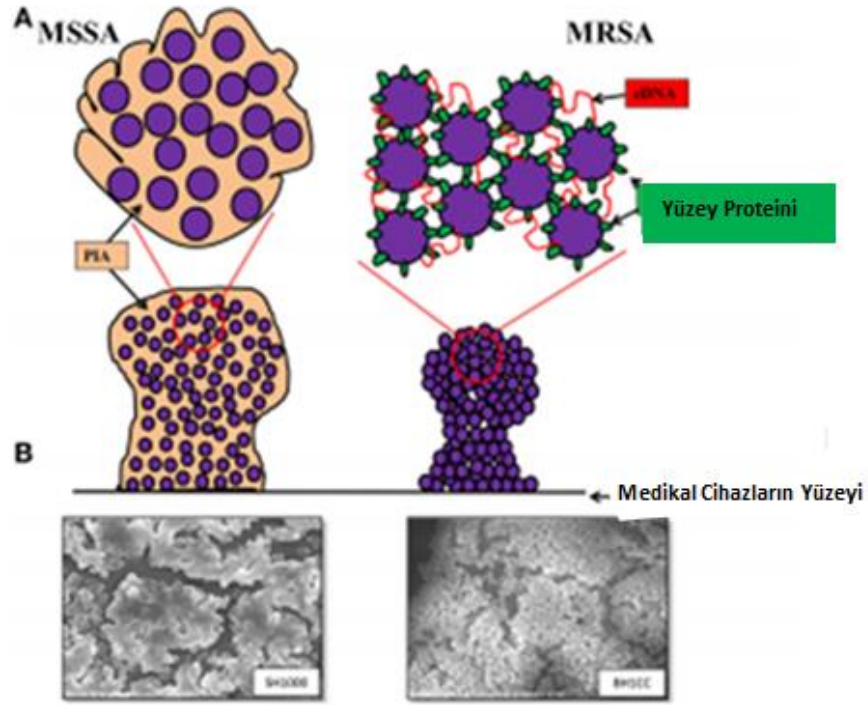
S.aureus'ta metisilin duyarlılığı ile *ica*'ya bağımlı biyofilm oluşumu arasındaki anlamlı ilişki, ilk olarak MSSA tarafından biyofilm oluşumu için PIA üretiminin gerekli olduğu ancak MRSA tarafından gerekli olmadığı bildirilmiştir (93). MSSA biyofilmleri *ica* operon ekspresyonunu aktive ettiği bilinen NaCl ile desteklenmiş büyüme ortamında önemli ölçüde indüklenmektedir (93, 97). Ayrıca MSSA biyofilmleri sodyum metaperiyodat işlemine (polisakkarit bağlarını oksitleyen) duyarlıdır ve proteinaz K ile işleme dirençlidir (93). *ica* lokusunun silinmesi (*sarA* mutasyonunun sebep olduğu gibi) genetik manipülasyona uygun klinik MSSA izolatları arasında biyofilm oluşturma yeteneğini ortadan kaldırmıştır (93).

2.2.2. Metisiline Dirençli *S. aureus* Tarafından Biyofilm Oluşumu

MSSA klinik izolatları tarafından eksprese edilen NaCl ile indüklenen biyofilmden farklı olarak, MRSA izolatları tarafından biyofilm oluşumunun, kültür ortamının asitlenmesiyle ilişkili olan büyüme ortamına glikoz eklenmesiyle indüklenme olasılığı önemli ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Resim 1) (93).

MRSA biyofilmleri, sodyum metaperiyodat işlemine dirençlidir ancak proteinaz K işlemine karşı duyarlıdır, bu biyofilm fenotipi protein adezinleri içerir (93). MSSA izolatlarında olduğu gibi, *sarA*'daki mutasyon, klinik MRSA izolatları tarafından biyofilm oluşumunu da ortadan kaldırmaktadır (91, 93). *sarA*, *sspA*, *sspB*, *aur* ve *scpA* (98) dört majör ekstraselüler proteazın supressörü olarak bilinmektedir. MRSA *sarA* mutantları tarafından bozulmuş glikoz kaynaklı biyofilm oluşumunun, *S. aureus* biyofilm üretimini engelleyebilen proteaz aktivitesinin yukarı regülasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (99).

Aksesuar gen düzenleyici (Agr) sisteminde bir silinme, klinik MRSA suşları tarafından biyofilm oluşumunu arttırmaktayken, MSSA suşları tarafından oluşturulan biyofilmler üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (93). *sarA*'nın aksine, Agr, dört ana proteazın ekspresyonunu pozitif olarak düzenlemektedir (100).



Resim 1. MSSA ve MRSA’da biyofilm oluşumu.

MSSA suşları *ica*’ya bağımlı, PIA aracılı biyofilmler oluşturmaktadır.

A) MRSA suşları PIA’dan bağımsız biyofilmler oluşturmaktadırlar. MRSA’da yüzeylerin kolonizasyonu ve biyofilm birikimi için fibronektin bağlayıcı proteinler ve yüzey proteinlerine ihtiyaç duyulur.

B) %4 NaCl içeren BHI besiyerinde MSSA suşunda biyofilm oluşumu (101).

2.2.3. Metisilin Direnci Biyofilm Fenotipi ve Virülansı İlişkisi

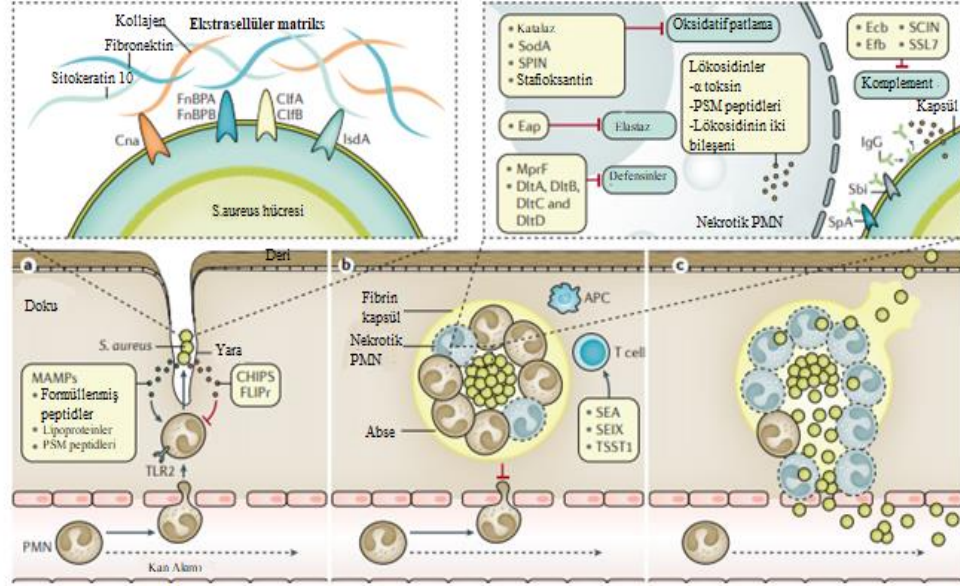
MRSA ve MSSA biyofilm fenotipleri ve sırasıyla polisakkarit ve protein adezinlerinin kullanımı arasındaki ilişkiyi destekleyen mekanizma(lar) tam bilinmese de beta-laktam antibiyotiklere direnç seviyesi, biyofilm fenotipi için önemli görünmektedir. Örneğin, hastane MRSA suşu BH1CC'den *SCCmec* elementi eksizyonu, muhtemelen yukarı-regüle proteaz aktivitesi nedeniyle FnBP aracılı biyofilm oluşumunun azalmasıyla ilişkilendirilmektedir (102, 103) Metisilin direnci ve biyofilm arasındaki ilişki, MRSA suşlarının metisiline karşı düşük düzeyde

heterojen direnç (HeR) veya yüksek düzeyde homojen direnç (HoR) gösterebildiği gözlemleriyle daha da karmaşık hale gelmektedir (104, 105). Tek başına *mecA* geninin taşınması HoR fenotipini oluşması için yeterli olmamakta ek genetik olaylara da ihtiyaç duyulmaktadır (102, 105, 106). Laboratuvarında, HeR suşlarından homojen olarak dirençli suşların izolasyonu, klinik olarak kullanılan metisilin türevi bileşiklerin besiyerine yüksek konsantrasyonlarda (100µg/ml) katılmasıyla elde edilebilmektedir (102, 106). Diğer yandan MRSA'daki yüksek seviyeli PBP2a ifadesi, *agr* kuorum sensing operonunun baskılanması ile ilişkilidir (102, 103). MRSA'daki *agr* baskılanması, doğrudan *mecA* ekspresyonu ile bağlantılıdır ve hücre duvarı mimarisindeki değişikliklere, azaltılmış sitotoksin üretimi ve zayıflatılmış virülans eşlik eder. *agr*'nin baskılanması, in-vitro bakteri çoğalmasını sonraki aşamalarında toksin ve enzim salgılanmasını koordineli olarak bloke eder ve hücrenin *agr* düzenleyici döngüsünün yüzey protein ekspresyonu aşamasında blokasyonuna neden olur (103). Yukarıda belirtildiği gibi, artan yüzey protein ekspresyonu ve ekstrasellüler proteaz üretiminin baskılanması da protein aracılı MRSA biyofilm fenotipi ile tutarlıdır (102).

2.3. Enfeksiyon Oluşumu

S. aureus SSTI'ler genellikle ana rezervuar burundan (muhtemelen el teması yoluyla) derideki açık mikro lezyon ve yaralara bakteri transferi gerçekleşmektedir (107) (Resim 2a). Böylece, mikroorganizma, açık yaralar yoluyla derin dokulara ulaşır ve *S. aureus* yüzey proteinleri (örneğin, fibronektin bağlayıcı protein A (FnBPA), FnBPB, kümelenme faktörü A (ClfA), ClfB ve kollajen adezin (Cna)) ile hücre dışı matriks proteinlerine bağlanır, bakterilerin yaralı dokuya adezyonu gerçekleşir ve üremeye başlar (108). *Staphylococcus aureus* ayrıca PMN kemotaksisinin aktivatörlerini ve inhibitörlerini içeren yollarla polimorfonükleer lökosit (PMN) akışını kısmen düzenleyebilmektedir (109). PSM (fenolde çözünür modülün) peptitleri ayrıca Toll benzeri reseptör 2'yi (TLR2) aktive ederek ve lokal inflamasyona yol açmaktadır. *S. aureus* mikroorganizma ile ilişkili moleküler patern (MAMP) molekülleri olan proinflamatuvar lipoproteinlerin salınımını tetiklemektedir (Resim 2a).

S. aureus'un yapay plastik veya metal yüzeylere adezyon özellikleri ve bu cisimler üzerinde biyofilm oluşturma kapasitesi, *S. aureus*'u kateterle ilişkili enfeksiyonların veya ventilatörle ilişkili pnömoninin sık görülen bir nedeni yapmaktadır (35).



Resim 2. *Staphylococcus aureus* enfeksiyonunun aşamaları (110).

S. aureus koagülaz proteinleri fibrin oluşturarak bakterileri ve infiltrate eden PMN'leri çevreleyen bir yalancı kapsül oluşumuna neden olmakta ve daha fazla lökosit akışını önlemektedir (111) (Resim 2b). *S. aureus* bir polisakkarit mikrokapsül (55) üretimiyle ve kompleman (112) inhibisyonu ile opsonizasyonu engelleyebilmektedir. PMN'ler tarafından fagosite edilen bakteriler, hem PMN öldürme mekanizmalarına (52, 113) karşı koyarak, hem de sitolitik toksinlerin yardımıyla onları kademeli olarak yok ederek de hayatta kalabilmektedirler. Sözgelimi birçok CA-MRSA suşu, porlar oluşturan peptit ve konak türe özgü olan ve konak lökosit membranlarına bağlanan protein toksinleri, α -toksin (α -hemolizin olarak da bilinir) ve Pantone-Valentine Lökosidin (PVL) üreterek hücre membranında porların oluşmasına ve litik hücre ölümüne neden olmaktadır (10, 72) Bu durum bakteriyel virülansı arttırmaktadır. Ayrıca, stafilokok kompleman inhibitörü (SCIN), fibrinojen bağlayıcı protein (Efb), ekstrasellüler kompleman bağlayıcı protein (Ecb) veya stafilokokal süperantijen benzeri protein 7 (SSL7) gibi küçük düzeyde salgılanan inhibitörler tarafından

kompleman sinyal yolunu inhibe edebilir. Fagosit edilmiş bakteriler, katalaz, süperoksit dismutaz, stafilokokal peroksidaz inhibitörü, stafiloksantin ve hücre dışı adezyon proteini üreterek ve çoklu peptit direnç faktörü ve d-alanin transfer proteinleri DltA, DltB, DltC ve DltD'nin aracılık ettiği hücre zarfı modifikasyonları üreterek PMN'ler içinde hayatta kalabilmekte defensinlere karşı korunmaktadır. Aktive veya nekrotik PMN'lerin neden olduğu masif inflamasyon, antijen sunan hücrelerin MHC sınıf II'ye bağlanan ve T hücrelerinin büyük bir kısmını spesifik olmayan şekilde aktive eden *S. aureus* süperantijenleri (Toksik şok sendromu toksini 1 (TSST1), enterotoksin tip A (SEA), stafilokokal enterotoksin benzeri X (SEIX) vs.) tarafından daha da arttırmakta, 'sitokin fırtınası' olarak bilinen sistemik hiperinflamasyona neden olmaktadır (114).

2.3.1. Sistemik Enfeksiyon

Apseler daha sonraki aşamalarda patlayarak patojenin cilt yüzeyine ya da kan dolaşımına yayılarak bakteriyemiye sebep olabilmektedir (Resim 2c). *S. aureus* endotel yüzeylerine ve trombositlere yapışabilmekte (115, 116) bu adezyon endokarditi başlatabilmektedir. Bu durum metastatik apse oluşumunu teşvik edebilmekte veya antibiyotik ve konak savunma molekülleri ile ulaşmanın zor olduğu endotel hücrelerine bakteri bulaşını indükleyebilmektedir (117). Koagülazların aglütinasyon aktivitesi bakterilerin endovasküler yayılımını kontrol altına alamıyorsa sistemik kan pıhtılaşmasına yol açar ve süperantijen toksininin indüklediği sitokin fırtınaları ile mikroorganizma ilişkili moleküllerinin büyük miktarda salınımı sonucu fulminan sistemik inflamasyon, sepsis ve çoklu organ yetmezliğine yol açabilmektedir (118).

2.4. Sessiz Salgınlar: Yaralar

Yaraların çeşitli nedenleri olabilmektedir. Bazıları cerrahi müdahaleden kaynaklanır, bazıları travma sonucu oluşurken bazıları da basınç veya kesme gibi dış faktörlerin veya diyabet, damar hastalığı gibi altta yatan durumların bir sonucudur. Genellikle altta yatan nedenlere bağlı olarak cerrahi yaralar ve yanık yaraları akut yara, bacak ülserleri, diyabetik ayak ülserleri (DFU'lar) ve basınç ülserleri gibi yaralar kronik yara olarak sınıflandırılmaktadır (119). Sebebi ne olursa olsun yaraların, sahiplerinde, bakıcıları ve sağlık sistemi üzerinde önemli ancak çoğu zaman fark edilmeyen bir etkisi vardır. Aslında, yara fenomeni 'Sessiz Salgın' olarak adlandırılmaktadır (120). Bir yara ile yaşamak yaşam kalitesi üzerinde derin bir etkiye sahip olabilir (121). Yaraların ağrı, sosyal izolasyon, kaygı, hastanede kalma süresinin uzaması, kronik morbidite ve hatta mortalite sebebi olabildikleri bilinmektedir. Bütün bunların yanında tedavileri için de ciddi maliyetler gerektirmektedir. Bu sorunların çoğu önlenabilir sorunlardır (122). Hastanın yaşı ve kronik komorbiditelerin varlığı gibi altta yatan faktörler nedeniyle bazı yaralar normal iyileşme sürecini takip etmez. Bu 'iyileşmesi zor' yaralar (düzenli ve zamanında 'standart tedavi' ile iyileşmeyen yaralar) (123) yaşam kalitesinde bozulmaya neden olmakta ve sağlık sistemi üzerindeki yükü de arttırmaktadır. Bazen, yara yönetiminin finansal maliyetinin sadece sargı, bandaj veya topikal antiseptikler gibi kullanılan malzemelerin maliyeti olduğu düşünülmektedir. Oysa maliyetin çoğu hastanede kalış süresinin uzamasıyla artan maliyetle ilgilidir. Avrupa'da (Birleşik Krallık ve Danimarka) yapılan prevalans çalışmalarında 1000 kişide 3-4 yara vakasının olduğu bildirilmiştir (124-126). Bu yaraların çoğunun "kronik" hal aldığı, bunların %15 kadarının ise tedavilerinin 1 yıldan fazla sürdüğü (124) ve bu durumun hastalara, ailelerine ve sağlık sistemlerine uzun süreli bir yük getirdiği bildirilmektedir. Bu rakamlardan yola çıkarak 1 milyonluk bir nüfusta yaklaşık 3500 kişinin yarayla yaşayacağı ve bunlardan 525'inin yarasının 1 yıldan fazla süreceği tahmin edilmektedir. Kronik yaraların çoğu klinik veya evde sağlık hizmeti gibi akut olmayan sağlık bakım ortamlarında tedavi edilmektedir (124, 126). Çalışmalar yara yönetiminde Avrupa ortamlarındaki toplum sağlığı hemşiresi kaynaklarının yarısından fazlasının görev aldığını göstermektedir (122, 127). Bununla birlikte önemli sayıda yaralı kişi bir aşamada hastanede tedaviye ihtiyaç duymakta ve bu da bakım

maliyetlerini önemli ölçüde artırmaktadır (122, 128). Literatürde hastane yataklarının %27-50'sinin bir çeşit yara tedavisi gerektiren hastalar tarafından doldurulduğu bildirilmiştir (122).

2.4.1. Yaraların Prevelansı

Avrupa genelinde yaklaşık 1.5-2 milyon insanın kronik bir yaradan müzdarip olduğu tahmin edilmektedir (129). ABD'de ise kronik yaralı insan sayısının yaklaşık 6.5 milyon olduğu tahmin edilmektedir (130). Avrupa'da evde bakımda tedavi edilen yaraların %64'ünün kronik yara olduğu bildirilmiştir (124). Bu kronik yaraların %24'ünün yaralarıyla 6 ay veya daha uzun süredir yaşadığı ve yaklaşık %16'sının bir yıl veya daha uzun süredir iyileşmediği bildirilmiştir (126). Hastaneden alınan verilerde ise yatarak tedavi gören hastaların %50'sinin yara enfeksiyonu olduğu bildirilmiştir. Batı Avustralya'da yapılan bir araştırmada hastanede yatan 5800 hastanın %49'unda yara enfeksiyonu bulunduğu bildirilmiştir. Hastaların %31'inde akut yara, %9'unda basınç ülseri ve %8'inde cilt rüptürü rapor edilmiştir. Bu yaraların ise dörtte birinin önlenebilecek potansiyelde olduğu bildirilmiştir (131). ABD'de ise yoğun bakımda tedavi gören hastaların %22'lik bir bölümünün basınç ülserine sahip olduğu bildirilmiştir (130). Avrupa ise bu oranın Amerika'daki oranlara çok yakın olduğu rapor edilmiştir (122, 132).

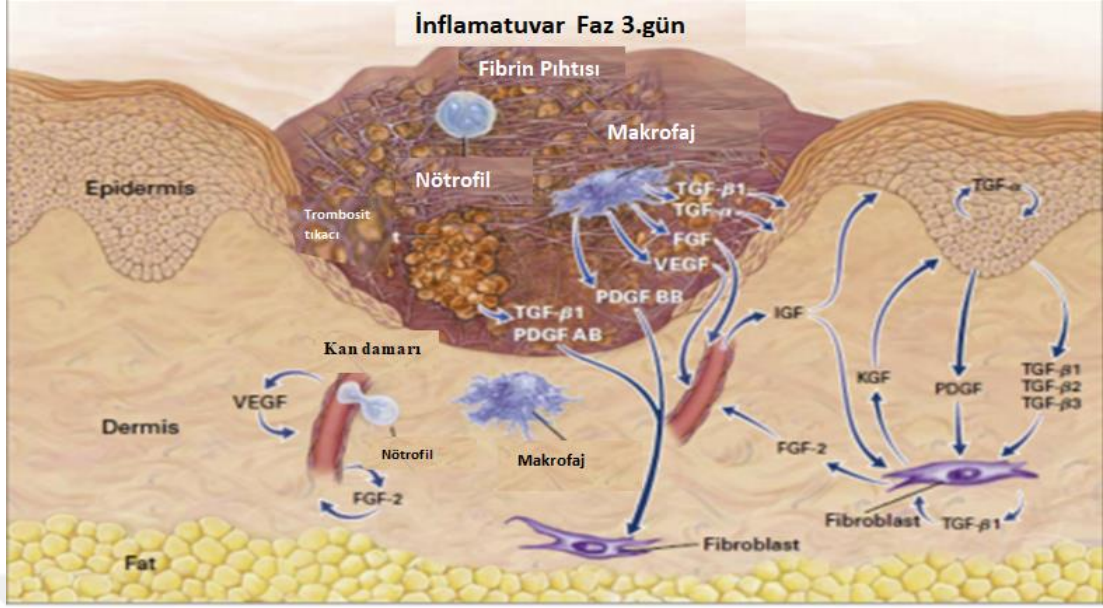
2.5. Yara İyileşmesinin Aşamaları

Yara iyileşmesi çevrenin de olaya dahil olduğu oldukça komplike olaylar zinciridir. Deri koruyucu bir organ olup termoregülasyon, nem regülasyonu, hissetme ve iletim gibi hayati işlevleri sağlamaktadır. Onarım ve yenilenme yeteneği bu işlevlerin merkezinde yer alır. Yara onarımı, hücre tipi ve mikro çevreye bağlı olaylar dizisidir.

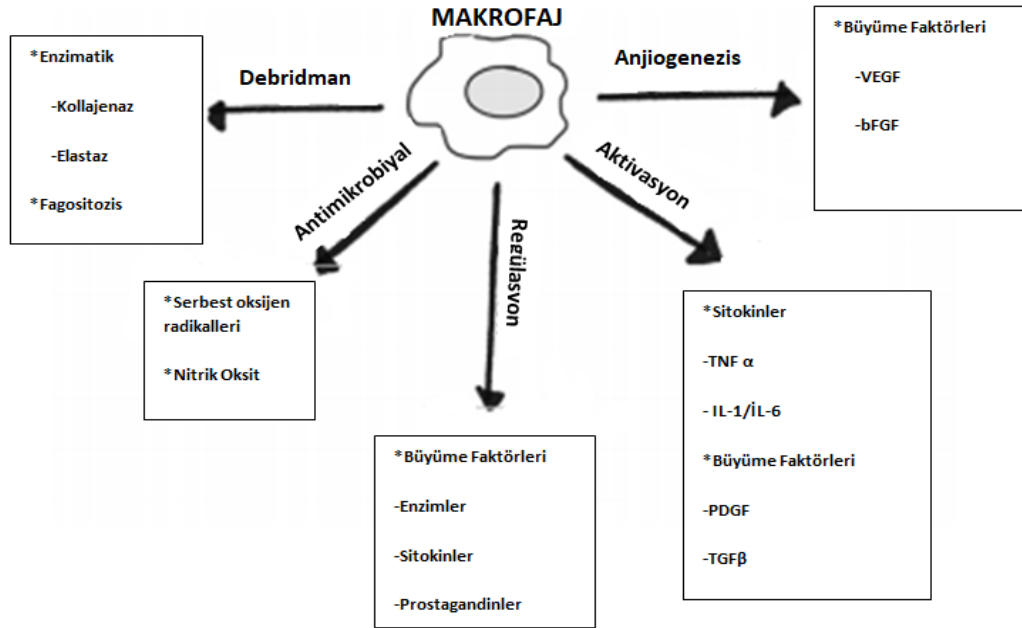
2.5.1 Enflamasyon Fazı

Bir yara meydana geldiğinde kanamayı sınırlayan ve sitokin sinyalizasyonun başladığı bir trombosit tıkaçı oluşmaktadır. Böylece koagülasyon kaskadı başlamakta ve cansız dokuların debridmanı için hücre amplifikasyonunu ve iyileşmesini teşvik etmektedir. Trombositler açığa çıkan kollajene yanıt olarak tıkaçı oluşturur, bu da devam eden trombosit agregasyonunu destekleyen ADP'yi serbest bırakır. Agregasyona, kandaki nötrofiller için kemotaktik olan platelet derive kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve transforme büyüme faktörü beta (TGF- β)'nın salınımı eşlik etmektedir (133, 134). PDGF'ye yanıt olarak nötrofiller trombosit tıkaçına gelir ve burada tutulur (133). Debridman sırasındaki ilk temizleyicilerdir. Başlangıçta ölü doku ve bakteri partiküllerini fagosite etmeye ve reaktif oksijen türlerini kullanarak bakterilere uygun olmayan bir yara oluşturmaya çalışırlar. Nötrofiller ayrıca, anahtar bir proinflatuar sitokin olan ve keratinositlerin proliferasyonunu uyaran interlökin (IL)-1 in salınımını sağlamaktadırlar (135). Bu sırada lokal değişiklikler de oluşmaktadır. Başlangıçta, katekolamin salınımıyla şiddetli vazokonstriksiyon mevcuttur ancak vazokonstriksiyon kısa bir süre sonra azalmakta ve dolaşımdaki mast hücrelerinden histamin salınımına yanıt olarak daha sonra vazodilatasyon gerçekleşmektedir (136, 137) (Resim 3).

İnflatuar faz ilerledikçe makrofajlar 24-72 saat içinde baskın hücre tipi haline gelir. Makrofajların yara iyileşmesinin düzenlenmesindeki rolleri kritik olup iyileşme gerçekleştikçe değişir (138-140). Makrofajların iyileşmede temel rol oynadığı homeostazı sağlamada ve patolojik inflamasyonu önlemek için inflamatuar durumu kontrol altına alan anahtar bir rolü olduğu kabul edilmektedir (Resim 4).



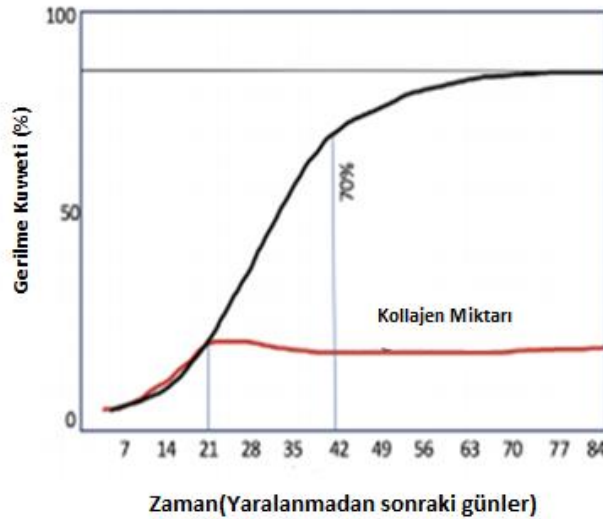
Resim 3. Enflamatuvar faz. Enflamatuvar fazda fibrin pıhtısı yaradaki ilk hücre olan nötrofilleri yakalamakta iyileşme sürecine makrofajları davet etmektedirler. FGF, fibroblast büyüme faktörü; KGF, keratinosit büyüme faktörü; VEGF, damar endotelial büyüme faktörü (141)



Resim 4. Makrofajın yaradaki rolü. Makrofajın debridman, antimikrobiyal etki, yara regülasyonu, sitokinler aracılığıyla hücresel aktivasyon ve büyüme faktörleri aracılığıyla anjiyogenez gibi birçok etkisi mevcuttur. Yaradaki en kritik hücrelerdir ve makrofajların etkisi olmadan yara iyileşmesinden söz edilemez. bFGF, temel fibroblast büyüme faktörü (142)

2.5.2 Proliferasyon Fazı

Proliferatif faz; 4.-21. günler arasında meydana gelmekte ve anjiyogenez, ekstrasellüler matriks (ECM) oluşumu ve epitelizasyonun görüldüğü evredir (142, 143). Yara iyileşmesinin aşamaları arasında önemli bir örtüşme olmasına rağmen, bir sonraki aşamaya geçiş yeteneği, bir yaranın uygun şekilde iyileşip iyileşmediğini belirlemektedir. ECM oluşumu muhtemelen trombosit degranülasyonu ile başlamaktadır. Çünkü PDGF, proteoglikan ve kollajen oluşumunun bilinen bir uyarandır. Lokal fibroblastlar, PDGF'ye yanıt olarak kollajen üretmekte ve yara kontraksiyonu için miyofibroblastlara dönüşmektedir. Fibroblastlar ayrıca keratinositlerden epitelizasyonu uyaran keratinosit kaynaklı büyüme faktörü (KGF) salgılamaktadır (144). Endotel hücreleri vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) üretmekte ve temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) kan damarların oluşumunu stimüle etmektedir. Normal yara iyileşme fizyolojisinin ayırt edici özelliği, yaklaşık 21 günde maksimum birikim ile devam eden kollajen üretimini durdurma yeteneğidir (Resim 5).



Resim 5. Yaralanma sonrası kollajen miktarı ve gerilim kuvvetinin zaman ile ilişkisi.

Kollajen birikimi yaralanmadan 3 hafta sonrasına kadar sürekli olarak artmaktadır. Bununla birlikte kollajen liflerinin çapraz bağlanmasına ve hizalanmasına ikincil olarak 3 hafta sonra yara kapanmasının gücü artmaya devam etmekte, altıncı haftada %70 seviyesine ulaşmakta ve tam olgunlaşmada yaklaşık %80-90 dolaylarında olmaktadır (145).

2.5.3 Maturasyon Fazı

Yaranın yeniden şekillenme fazı yaralanmadan üç hafta ile 1 yıl arasında gerçekleşmektedir. Yara kontraksiyonu ve kollajen şekillenmesi ile karakterizedir. Makrofajlar proliferasyonda temel hücre tipi olup fibroblastlar yeniden şekillenmede temel hücre tipidir. Ayırt edici süreç tip III kollajenin tip I'e dönüştürülmesidir (146). Tip I ve tip III arasındaki denge yaklaşık 30 gün sonra oluşmakta ve maksimum mukavemet kabaca 42-60 gün sonra ortaya çıkmaktadır. Geleneksel altı haftalık aktivite kısıtlaması tavsiyesi bu nedenledir. Başarılı yara iyileşmesi, yara kenarlarındaki dokunun yeterli oksijenlenmesine bağlıdır. Yetersiz oksijenasyon genellikle aşırı gerilimden veya distal dokulara yetersiz oksijen iletiminden kaynaklanan lokal boğulmaya bağlanabilir. Doku hareketliliğini iyileştirmek için lokal önlemler alınabilir, çünkü aşırı gerilim, başarısızlığa yol açan klinik bir yanlış hesaplama değildir.

2.6. Kapsaisin

Geleneksel bir baharat olan biber (*Capsicum. annuum.*), vitaminler, mineraller, karotenoidler ve kapsaisinoidler açısından zengin olup, küresel ekonomik tarımda en önemli bitkisel ürünlerden biridir. Güney Amerika'ya özgüdür ve dünya nüfusunun dörtte biri her gün kırmızı biber tüketir (147). Meksika menşeli acı biber, muhtemelen MÖ. 7000 kadar erken bir tarihte Meksika Kızılderilileri'nin diyetinin bir parçası olmuştur. Biber sadece ekonomik öneminden dolayı değil, aynı zamanda meyvelerinin ve baharatların gıda boyası ve tatlandırıcı olarak kullanılan besinsel ve tıbbi değeri nedeniyle de popüler olarak kullanılmaktadır. Dünyanın biber üretimi son 20 yılda 1993'te 12 milyon tondan 2013'te 31 milyon tonun üzerine çıkmıştır (148). Şimdiye kadar Çin dünyanın en büyük biber üreticisi haline gelmiştir Çin'i Meksika, Türkiye ve Endonezya izlemektedir. Amerika ve Hindistan sırasıyla en büyük ithalatçı ve ihracatçı ülkelerdir (149).

Kapsaisin (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamid, $C_{18}H_{27}NO_3$), yanma ve tahriş edici sonuçlardan sorumlu olan, biberlerden elde edilen uçucu ve keskin bir bileşiktir. İlk olarak 1876 yılında bulunmuş ve keskinliği ile tanınmış, daha sonra kesin

kimyasal yapısı 1923 yılında belirlenmiştir (150) son olarak 1930'da Spath ve Darling tarafından kimyasal olarak sentezlenmiştir (151). Kapsaisin bir benzen halkası ve polar bir amid grubu ile uzun bir hidrofobik karbon kuyruğundan oluşur (152). Kapsaisin kapsaisinoidlerdeki en yüksek içeriklerden biridir ve bunu sırasıyla %69, %22 ve %7 ile dihidrokapsaisin ve nordihidrokapsaisin takip etmektedir (153). Son yıllarda, çok sayıda çalışma, Kapsaisin'in antioksidan ve antienflamatuar özellikler, kan basıncını düşürme, kilo verme, ağrı kesici ve kanseri önlemedeki yararlı rolünü ortaya koymuştur (154).

Sekonder bitki metabolitleri, gıda katkı maddesi, pigment, farmasötik ve biyopestisit gibi farklı alanlarda kullanılan önemli bir ekonomik grubu oluşturur (155). *Capsicum annum* L. türünün biyolojik olarak aktif bileşenlerinden türetilen ikincil metabolit grubundaki en önemli bileşen, alkaloid-kapsaisinid grubudur.

Kapsaisinoidler benzilamin türevleridir. Yapılarındaki farklılıklar esas olarak açıl kısımlarına bağlı olup üç yapısal eleman söz konusudur: İlki, açıl zinciri (C8-C13), daha sonra sonlanma yolu (doğrusal, iso veya anteiso-serileri) ve ω -3 (Kapsaisin tip) veya ω -4 karbon atomunda (homoKapsaisin tip I ve II) doymamışlık varlığı veya yokluğu (156).

Homovanillik asit türevi (8-metil--N-vanilil-6-nonenamid), Kapsaisin, kırmızı biberin aktif bir bileşenidir. Mevsim biberindeki Kapsaisin seviyesinin % 0.025 ve acı biber ise bu oranın % 0.25 dolaylarında olduğu bildirilmektedir (157).

Kapsaisin olağanüstü çok yönlü bir ajan olup çok çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir. Bunun yanında nütrisyon, kimyasal silahlarda dahi kullanım alanları bulunmaktadır. Hatta Kapsaisin'in köpekbalığı kovucu olarak dahi kullanıldığı bildirilmiştir. Kapsaisin, kapsaisinoidler grubunun %69'unu, dihidrokapsaisinoidler %22'sini, nordihidrokapsaisinoidler %7'sini ve homokapsaisin ve homohidrokapsaisin ise sadece %1'lik kısmını oluşturmaktadır. Kapsaisin ve dihidrokapsaisin, nordihidrokapsaisin ve homokapsaisin'den yaklaşık iki kat daha keskin olup, biberin acılığından asıl sorumlu olan komponentlerdir (156).

2.6.1. Kapsaisin'in Biyoaktivitesi, Farmakolojik Etkileri ve Mekanizmaları

Gıda, tarım, kimya mühendisliği ve tıp alanında geniş bir uygulama alanına sahip olan Kapsaisin'in çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi olduğu da bildirilmiştir (158). Kapsaisin-kitosan karışımı filmler, gıda paketlenme materyali olarak ve cilt yaralarını iyileştirmede de kullanılmıştır (159). Yenilebilen Kapsaisin-kitosan filmlerinin çeşitli gıda ve insan patojen mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri bildirilmiştir (159). Tüm mikroorganizmaların inhibisyon zon çapları artan Kapsaisin miktarı ile doğru orantılı olarak artmıştır. Ayrıca, Kapsaisin umut verici bir ilaç gibi görünmektedir, bazı hastalıklar üzerinde terapötik etkili olduğu bildirilmiştir. Zaman ve konsantrasyona bağlı olarak çalışmalarda *Helicobacter pylori*'nin üremesini spesifik olarak inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu nedenle Kapsaisin, organizmanın büyümesini ve kolonizasyonunu inhibe ederek *H.pylori* ile ilişkili hastalıkta terapötik bir etkiye sahip olabileceği düşünülmüştür (160). Kapsaisin, *H. pylori* kaynaklı gastrik mukozal hasarı önlemek için bir antiinflamatuvar ilaç gibi gastrik epitel hücreleri tarafından salınan IL-8 üretimini inhibe edebilmiştir (161). Kapsaisin *Streptococcus mutans*'ın biyofilm oluşumunu ve asit üretimini azaltmış ve a-hemolitik streptokoklara karşı anti-karyojenik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bu da diş çürüğünün patogenezinin önlenmesinde Kapsaisin'in etkili olabileceğini düşündürmektedir (162). Kapsaisin ayrıca, sırasıyla 16 mg/L ve 64 mg/L minimum inhibitör konsantrasyon ve minimum bakterisidal konsantrasyon ile *Porphyromonas gingivalis* üremesinin inhibisyonuna ve ayrıca periodontitisin yardımcı tedavisinde kullanılabileceği, *P.gingivalis* biyofilm oluşumunun inhibisyonunu sağladığı da saptanmıştır (163). Kapsaisin'in bakteriler üzerindeki inhibitör etkisi, yapısıyla ilgili olabilir. Fenolik grubu hidrofobikliği nedeniyle membran stabilitesini azaltarak bakterilerin üremesini baskılamaktadır (164). Ayrıca, doymamış doğal alkamitler ile Kapsaisin yapısının mikroorganizmalar için toksik olduğu, gram pozitif ve gram negatif bakteriler arasında toksisite açısından bazı farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (165). Olası antimikrobiyal mekanizmalar, ozmotik stres ve plazma membran hasarı oluşturabilmektedir (166).

2.7. Nisin

Nisin, *Lactococcus* ve *Streptococcus* gibi bazı gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen antimikrobiyal bir peptiddir (167). Nisin ilk olarak 1928'de fermente süt kültürlerinde tanımlanmış, 1953'te İngiltere'de antimikrobiyal bir ajan olarak pazarlanmıştır (168). Nisin FAO / WHO tarafından 1969 yılında güvenli bir gıda katkı maddesi olarak onaylanmıştır. Şu anda Nisin 50'den fazla ülkede lisanslı ve gıda endüstrisinde farklı gıda türleri için doğal bir biyo-koruyucu olarak kullanılmaktadır (167). Amerika Birleşik Devletleri'nde, Nisin Gıda ve İlaç İdaresi tarafından 1988'de onaylanarak genellikle işlenmiş peynirlerde kullanımının güvenli olduğu kabul edilmiştir (169).

Bir Nisin varyantı olarak tanımlanan Nisin A, 34 amino asitten oluşmakta ve *Lactococcus lactis* tarafından sentezlenmektedir (170). Nisin, Tip A (I) lantibiyotikler olarak adlandırılan bir grup antimikrobiyal katyonik peptit grubuna aittir (171). Nisin, güçlü ve geniş spektrum aktiviteleri, antimikrobiyal konsantrasyonda bakteriyel direnç gelişimini teşvik etme ve hücrel sitotoksite ihtimalinin düşük olması sebebiyle önemli ve dikkat çekici bir metabolik üründür (172). Diğer lantibiyotikler gibi Nisin enzimatik post-translasyonel modifikasyonların bir sonucu olarak birkaç olağandışı amino asit içermektedir (173).

Nisin, diğer lantibiyotiklerin de karakteristiği olan beş lantionine halkası oluşturan tiyoeter amino asitleri ve dehidrate amino asit rezidüleri (serin ve treonin) içermektedir (174). Nisin gıdalardaki çoğunlukla gram-pozitif bakterilere karşı geniş spektrumlu bir bakteriyosin olarak kullanılmaktadır (175). Araştırmalar Nisin'in sadece gıdalarla ilişkili olan mikroorganizmalara karşı etkili olmadığını göstermiştir (172). Çalışmalarda pürifiye Nisin ve Nisin'in diğer antibiyotiklerle kombinasyonunun gram-negatif patojenlere karşı etkili olabileceğini ve bazı biyomühendislik ürünü Nisin varyantlarının hem gram-pozitif hem de gram-negatif patojenlere karşı aktivitesini artırabildiği gösterilmiştir (15). Buna ek olarak, biyoteknolojideki son gelişmelerle birlikte araştırmacılar, biyomühendisliğini yaptıkları yeni Nisin varyantlarının insan hastalıkları için terapötik potansiyele sahip olduğunu görmüşlerdir (16).

Nisin, keşfinden bu yana gıda endüstrisinde alternatif bir biyo-koruyucu olarak önem kazanmıştır. Bununla birlikte, son 40 yıldaki güvenilirliği ile, Nisin kullanımı,

biyomedikal alan gibi çok çeşitli farklı alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Birçok lantibiyotigin (ve daha geniş olarak, diğer bakteriyosinlerin) antimikrobiyal aktivitesinin ötesinde ek biyolojik aktivitelere sahip oldukları bildirilmiştir (176). Örneğin, Nisin, bakteriyel enfeksiyonlar, kanser, oral hastalıklar ve daha fazlası dahil olmak üzere biyomedikal uygulamalarda yararlı özelliklere sahiptir.

2.8. Kumarin

Fitokimyasallar bitki dünyasında doğal olarak bulunan kimyasal bileşiklerdir. Bazıları, içinde bulundukları doğal kaynakların organoleptik özelliklerinden sorumludur. Fitokimyasal denince genellikle karotenoidler, flavonoidler, kumarinler veya kromonlar gibi biyolojik önemi olan kimyasallar akla gelmektedir. Günümüzde fitokimyasalların tamamı temel besin maddeleri olarak belirlenmemiştir. Kanser, metabolik veya dejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıklara karşı potansiyel aktiviteye sahip 4.000'e kadar farklı fitokimyasal olduğu bildirilmiştir. Bunlar arasında Kumarin'ler, doğada yaygın olarak bulunan bir benzopiron (1,2-benzopiron veya 2H-1-benzopiran-2-on) ailesidir. Kumarin'ler tipik bir benzopiron yapısı taşıyan doğal olarak oluşan ve/veya oksijen içeren sentetik heterosikliklerin önemli bir ailesini temsil etmektedirler (177).

Doğal bir ürün olarak tanımlanan Kumarin'in ismi 1820'de ilk kez tanımlandığı bitkiden gelmektedir (Tonka fasulyesi, coumarou, *Dipteryx odorata* (Coumarouna odorata) tohumları (Fabaceae/Leguminosae)). Kokusu, yeni biçilmiş ot kokusu olarak tanınlanmaktadır. Kumarin 1882'den beri parfümlerde de kullanılmaktadır. Yenilmesini caydırmak için bitkiler tarafından kimyasal bir savunma ürünü olarak salgılandığı düşünülmektedir (18).

Kumarinik bileşikler, alfa piron halkasına kaynaşmış bir benzen halkası tarafından yapısal olarak inşa edilmiş bir lakton sınıfı olup esasen zengin elektron ve yük taşıma özelliklerine sahip konjüge sisteme sahiptir (178). Kumarin yapısının basitliği ve çok yönlülüğü onu çeşitli uygulamalar için dikkat çekici bir hale getirmektedir (19). Kumarinler parfüm, kozmetik ve endüstriyel katkı maddeleri içeriğinde kullanılmaktadırlar. Türevlerinin bir kısmı tütünlere ve bazı alkollü içeceklere aroma veren madde olarak katılmaktadırlar (179). Ancak en uygun rolü

doğal ürünler, organik kimya ve tıbbi kimyada tanımlanmaktadır (180). Kumarinlerin çeşitli farmakolojik aktivitesi, düşük toksisite ve yan etkileri, düşük ilaç direnci, yüksek biyoyararlanımı, geniş spektrumu gibi özelliklerinden dolayı ilaç sanayinde çok sayıda Kumarin bileşiği aktif olarak incelenmektedir (23).

Kumarin esaslı antikoagülan, antimikrobiyal (anti-viral, antifungal ve anti-parazitik), antioksidan (179), , antikanser (181), anti-diyabetik, analjezik, antinörodejeneratif ve anti-enflamatuvar (179) ajanların geliştirilmesi konusunda yoğun çalışılan doğal ürünlerden birisidir. Ayrıca, eşsiz ve çok yönlü oksijen içeren heterosiklik yapı Kumarin bileşiklerinin tıbbi önemini arttırmaktadır (182). Kumarinler biyoaktif ajanlar olmasının (24) yanı sıra, supramoleküler tıbbi ilaçlar, diagnostik ajanlar ve patolojik ve biyolojik boyalar (183) gibi çeşitli çalışmalarda da araştırılmışlardır. Özellikle, Kumarinik halkasındaki, elektronca zengin ve yük taşıma özelliklerine sahip olan büyük konjuge sistem, bu yapının moleküller ve iyonlarla etkileşimi açısından önemli bulunmaktadır.

Kumarin ilk olarak 1868'de sentezlenmiş ve ilaç endüstrisinde, dicoumarol (mevcut tedaviden çıkarıldı) ile başlayan bir dizi sentetik antikoagülan farmasötik maddenin sentezinde bir öncü olarak kullanılmıştır (184). Günümüze kadar, bazı Kumarin bazlı antikoagülan ilaçlar kliniklerde yaygın olarak kullanılmaktadır (185). Kumarinler bir tür K vitamini antagonistidir (186). Günümüzde birçok ülkede de kullanılmakta olan varfarin, acenocumarol ve phenprocoumon en çok dikkat çekenler arasındadır (187). Warfarin, daha uzun yarılanma ömrü (36 saat) nedeniyle acenocumarolden daha sık kullanılmaktadır, teorik olarak daha stabil antikoagülasyon sağlar ve acenocumarol tedavisi sırasında potansiyel olarak ortaya çıkan faktör VII dalgalanmalarını önler (yarı ömür 10 saat) (188). Günümüzde bazı Kumarinlerin nörodejeneratif hastalıklarda büyük potansiyele sahip enzimatik inhibitör ajan [monoamin oksidaz (MAO) inhibitörleri, asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörleri ve bütiril kolinesteraz (BuChE) inhibitörleri] oldukları gösterilmiştir (189).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 17.02.2020-15.12.2021 tarihleri arasında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapılmıştır. Çalışmada fitokimyasallardan Kapsaisin, Kumarin ve bir mikrobiyal ürün olan Nisin kullanılmış olup bu kimyasal maddeler laboratuvar kullanımına hazır şekilde ticari olarak temin edilmiştir. Proje kimyasal bileşiklerin non-toksik konsantrasyonlarının belirlendiği ve *in-vitro* antibakteriyel etkinliklerinin değerlendirildiği hücre kültürü çalışmalarını ve bu bileşiklerin deneysel olarak oluşturulmuş fare yara modelinde araştırıldığı hayvan deneyleri çalışmalarını kapsamaktadır. Bu çalışma için Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 23/03/2020 tarih ve 2020/03-12 numaralı etik kurul onayı alınmıştır. *In-vitro* deneylerde hücre kültürü olarak Vero (Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı) hücre hattı kullanılmıştır.

3.1. Araç ve Gereçler

- Karbondioksitli İnkübatör (Heal Force HF90, Çin)
- Düz Tabanlı Mikroplaklar (12, 24, 48 ve 96'lık) (TPP, Europe/Switzerland)
- Klas II Güvenlik Kabini (Heal Force, Çin)
- Bidistile Su Cihazı (Elix Essential 10 UV, Almanya)
- İnverted Mikroskop (Soif, Çin)
- Santrifüj (NF 048; Nüve, Türkiye)
- Hassas Terazı (Ohaus Corp., NJ USA)
- Thoma lamı (Isolab, Almanya)
- Otomatik Pipetler (Discovery, Transferpette, Almanya)
- Benmari (Gesellschaft Für Labortechnik, Almanya)
- Buzdolabı (Indesit TN 5 FNF-İtalya)
- Otoklav (Nuve OT 90L, Almanya)

- PCR sarfları
 - Taq polimeraz enzimi
 - dNTP's
 - Primer dizinleri
 - Solüsyonlar ve Bufferlar

3.2. Kimyasal maddeler

- RPMI-1640 Besiyeri (Sigma, ABD)
- Fetal Bovin Serum (Capricorn Scientific, Güney Amerika)
- Tripsin Enzimi (Biological Industries, İsrail)
- Dimetil Sülfoksit (Merck Kgaa, Almanya)
- Kanlı Agar (Biomeurieux, Fransa)
- Muller Hinton Broth (Merck, Almanya)
- Metisilin dirençli *S. aureus* ATCC 33592
- Kongo Kırmızısı Besiyeri
- Triton -X-100
- Fosfat Tuz Solüsyonu (PBS)
- Etil Alkol (Merck, Almanya)
- Tripan Mavisi (Sigma, ABD)
- Nisin (Sigma, ABD)
- Kapsaisin (Biovision, ABD)
- Kumarin (Sigma, ABD)

3.2.1. RPMI-1640 Besiyeri

Besiyeri ticari olarak toz (powder) olarak temin edildi. Laboratuvarda 2 gr Sodyum Bikarbonat (NaHCO_3) 1 lt besiyeri için hazır paket halindeki toz besiyerine eklendi ve 1 lt distile su ile erlenmayer içinde karıştırıldı. Homojenize olması için erlenmayerin ağzı kapatılıp karıştırıcıda 30 dk kadar karıştırıldı. Homojen hale gelen karışımın filtrasyon yöntemiyle sterilizasyonu gerçekleştirildi.

3.2.2. Versen-Tripsin Solüsyonunun Hazırlanması

8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 2.37 gr Na₂HPO₄ 12 H₂O, 0.2 g KH₂PO₄, 1 g titriplex III (versen) ve 1.25 gr tripsin 1 lt distile su ile erlenmayer içinde karıştırıldı. Erlenmayerin ağzı kapatılarak karıştırıcıda 30 dk. karıştırılıp homojenize edildi. Homojen hale gelen karışımın filtrasyon yöntemiyle sterilizasyonu gerçekleştirildi.

3.2.3. PBS hazırlanması

Son hacim 1 litre olacak şekilde 8 gr. NaCl, 0.2 gr. KCl, 2.37 gr. Na₂HPO₄ 12 H₂O ve 0.2 gr. KH₂PO₄ tartılarak bidistile su ile erlenmayer içinde karıştırıldı. Erlenmayerin ağzı kapatılarak karıştırıcıda 30 dk karıştırılıp homojenize edildi. 121 °C 15 psi 15 dk otoklavda sterilizasyonu yapıldı.

3.3. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Tayini

Hücre canlılığı tespitinde tripan mavisi yöntemi kullanıldı. Ölü hücrelerin membran bütünlüğünde bozulma olması nedeniyle boya ölü hücrelerin içine girer ve hücreleri boyar. Mikroskopta bakıldığında mavi boyanan hücreler ölü, boya almamış (mavi boyanmamış) hücreler canlı olarak tespit yorumlanır. Hücre canlılığı tespit için tripan mavisi boyası PBS ile %1 oranında karıştırıldı. Versen -Tripsin çözeltisi ile toplanan hücreler hazırlanan tripan mavisi boyası ile 1:1 olacak şekilde karıştırıldı. Oda ısısında 15 dk. bekletildikten sonra mikroskopta incelenerek hücre canlılığı tayini ve hücre sayımı yapıldı.

3.4. Stok Solüsyonların Hazırlanması

3.4.1. Kumarin Solüsyonu

Ticari olarak temin edilen (Sigma, ABD) Kumarin'in çözülmesi için solvent olarak dimetil sülfoksit kullanıldı. Kumarin'in stok solüsyonu 50 mg/ml olacak şekilde

hazırlandı. Deneylerde aktivite çalışmaları için kullanımdan hemen önce hazırlanan solüsyonun ışıktaki kalmamasına dikkat edildi.

3.4.2. Kapsaisin Solüsyonu

Ticari olarak temin edilen (Biovision, ABD) Kapsaisin'in çözülmesi için solvent olarak etanol kullanıldı. Kapsaisin'in stok solüsyonu 2 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Deneylerde aktivite çalışmaları için kullanımdan hemen önce hazırlanan solüsyonun ışıktaki kalmamasına dikkat edildi.

3.4.3. Nisin Solüsyonu

Ticari olarak temin edilen (Sigma, ABD; 20.000-40.000 IU/mL 0.02N HCl içinde çözünmüş kullanıma hazır solüsyon) Nisin'in deneylerde aktivite çalışmalarından hemen önce PBS ile dilüe edilen 10.000 IU/mL konsantrasyonu hazırlandı. Stok solüsyonun ışıktan korundu.

3.4.4. Mupirosin Solüsyonu

Ticari olarak temin edilen (Balaban %2 pomad) Mupirosin'den 1 g tartılarak 1 ml PBS içinde çözülerek homojenize edildi. Aktivite çalışmalarında solüsyonun taze hazırlanmasına ve hazırlanan solüsyonun ışıktan korunmasına özen gösterildi.

3.5. Kongo Kırmızısı Besiyerinin Hazırlanması

Ticari olarak temin edilen Brain-Hearth infusion (BHI) broth besiyerinden 37 g, 10 gr agar, 50 gr sükröz, 800 mg Kongo kırmızısı hassas terazide tartılıp erlenmayer içine konuldu. Bidistile suyla 1 litreye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda homojenize edildikten sonra sterilizasyon işlemi için otoklavize edildi. Sterilizasyon işlemi takiben petri kaplarına dökülerek soğumaya bırakıldı.

3.6. Çalışmada Kullanılan Suşlar

Deneylerde Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bakteri kültür koleksiyonumuzda bulunan Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşu (ATCC 33592) suşu kullanıldı.

3.7. Hücre Kültürü ve Kimyasal Bileşikler

Çalışmada gerek sitotoksikite testleri için gerekse de *in-vitro* etkinlik testleri için kullanılan Vero hücre hattı Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan, Kapsaisin, Nisin ve Kumarin ise ticari olarak temin edilmiştir.

Çalışmada hücre hücre kültürü deneylerinde hücrelerin çoğaltılması ve idamesi için içerisinde %10 oranında fetal dana serumu, 10 mM HEPES, 4 mM glutaminli 100 IU/ml penisilin/streptomisin ihtiva eden RPMI 1640 sıvı besiyeri kullanıldı. Hücrelerin inkübasyonu 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava bulunduran inkübatörde gerçekleştirildi. Hücrelerin üretilmesi için 1x10⁶ hücre/ml olacak şekilde farklı hacimlerde (100, 250 ve 500 ml'lik) kültür kaplarına kültür kabının yüzde 10'u nispetinde besiyeri bulunan kaplarda inkübe edildi. Hücrelerin çoğalması için 3-7 gün arasında üreme günlük takip edilerek hücreler kültür kabı yüzeyinde monolayer tarzda ürediklerinde pasaj işlemleri gerçekleştirildi. Inkübasyon süresi içinde besiyeri pH'ında değişme gözlemlendiğinde besiyeri değişimi yapıldı. Hücreler kültür kabından, hazırlanan tripsinizasyon solüsyonu ile kaldırılarak 50 ml'lik santrifüj tüplerine alınıp 1500 rpm'de 15 dk. santrifüj edilerek hücre pelleti toplandı. Hücre canlılığı ve sayısı %0,9'luk NaCl içinde hazırlanmış %1'lik tripan mavisi ile hemositometrede mikroskop altında belirlendi.

Aktivite deneyleri 24, 48 ve 96 kuyucuklu düz tabanlı mikrolaklarda yapıldı. Kuyucuklara içerisinde %10 oranında fetal dana serumu bulunan RPMI 1640 besiyeri ile ml'sinde 1x10⁶ hücre olacak şekilde hücre inoküle edildi. Çalışmada Kapsaisin, Nisin ve Kumarin bileşiklerini çözmek için kullanılan dimetil sulfokside (DMSO) (Sigma, MI, USA) ve etanolün seçilen konsantrasyonları negatif kontrol olarak kullanıldı. DMSO ve etanolün non-toksik konsantrasyonlarının belirlenmesi testleri

Vero hücre hattı kullanılarak gerçekleştirildi. Vero hücreleri 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde mikropaklara inoküle edildi. Mikropakların kuyucuklarına DMSO ve etanolün değişik konsantrasyonları (%8, 4, 2, 1 ve 0.5) üzerinde non-toksik konsantrasyon belirlenerek toksik olmayan bu konsantrasyon solvent olarak seçildi.

3.7.1. Hücre Canlılık Tayini

Çalışmada hücre canlılığı tayini, tripan mavisi boyama yöntemiyle gerçekleştirildi. Boyama yönteminin esası Tripan mavisi boyasına maruz bırakılan ölü hücreleri membran bütünlüklerinin bozulmasına bağlı olarak boyanmasına dayanmaktadır. Gerek Vero hücrelerinin pasajlanması ve gerekse de aktivite çalışmaları sırasında tripsinizasyon işlemi ile kaldırılan hücreler tripan mavisi ile muamele oda ısısında boya ile inkübe edildikten sonra mikroskopik olarak değerlendirildi. Boya alan (mavi boyanan) hücreler ölü olarak, boya almayan (açık renkte/maviye boyanmamış olan) hücreler ise canlı olarak değerlendirildi. Yüzde 1'lik tripan mavisi boyası PBS çözeltisi içinde hazırlandı. %0.25'lik versen-tripsin solüsyonu ile kültür kaplarından toplanan hücreler 1:1 oranında tripan mavisi ve hücre süspansiyonu olacak şekilde boyandı. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilen karışım mikroskopta incelenerek canlılık tespiti yapıldı. Hemositometre (Thoma lamı) ile hücre sayımı gerçekleştirildi.

3.7.2. Aktivite Çalışmaları

Hücre Kültürünün Hazırlanması

Öncelikle Kapsaisin, Nisin ve Kumarin'in Vero hücre kültüründe non-toksik konsantrasyonları belirlendi. Aktivite çalışmaları bu non-toksik konsantrasyonlar dahilinde gerçekleştirildi. Sitotoksik etki belirlenmesine yönelik çalışmalar aşağıda açıklandığı gibi MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemiyle yapıldı. Aktivite çalışmaları için Vero hücreleri her bir ml'sinde 1×10^6 hücre olacak şekilde hücre kültürleri hazırlandı. Hücre adezyonu için 6 saat inkübasyondan sonra kültür besiyerine kimyasal bileşiklerin farklı konsantrasyonlarını içeren miktarları (100; 75; 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 ve 0.78 µg/ml) eklendi.

Kontrol grubu olarak, içerisinde sadece solvent olarak kullanılan miktarda DMSO ve etanol ihtiva eden kültürler deney grubuyla aynı anda kültive edildi. Ayrıca, negatif kontrol olarak içerisinde kimyasal bileşen bulunmayan kültürler ve pozitif kontrol olarak da Mupirosin'in farklı konsantrasyonlarını (0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 mM) içeren hücre kültürleri kullanıldı. Tüm deneyler üç kopya halinde 2 kez tekrarlanarak yapıldı.

İnkübasyondan sonra kültür kabı yüzeyine yapışarak çoğalmasına devam eden hücreler %0.25'lik tripsinizasyon solüsyonu ile muamele edilerek santrifüj tüplerine alındı. Hücreler soğutmalı santrifüjde (+4 °C'de) 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek toplandı ve hücre canlılığı tayini yapıldı.

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

Yöntemi

MTT yöntemi ile kültive edilen canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam mitokondrianın MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. İlk olarak Mosmann tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley ve ark. (190) tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir). MTT, hücrelere aktif olarak

absorbe olan ve mitokondriye bağı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir (191). Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir. Çalışmada değişik konsantrasyonlarda (3200; 1600; 800; 400; 200; 100; 75; 50 ve 25 µg/ml olacak şekilde) Kapsaisin, Nisin ve Kumarin ile muamele edilen hücre kültürlerinde hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri MTT hücre yöntemiyle araştırıldı.

Kapsaisin, Nisin ve Kumarin'in monolayer tarzda üreyen Vero hücreleri ile muamelesini takiben hücre sitotoksitelerinin belirlenebilmesi için methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide muamelesinden sonra 37 C'de 4 saat inkübe edildi. Daha sonra ölen hücrelerdeki formozan kristallerinin çözünebilmesi için dimetil sülfoksit eklenerek, 10 dakika bekletildi.

Ardından optik yoğunluk tayini spektrofotometrik (ThermoFisher Scientific, USA) olarak ölçülerek değerlendirildi. Tüm testler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.8. Vero Hücre Hattında Kapsaisin, Nisin ve Kumarin Varlığında *S. aureus* Üremesinin İncelenmesi

Çalışmada yukarıda belirtilen konak koşulları sağlandığında iki bakterinin ayrı ayrı üremelerindeki değişimleri belirlemek için Vero hücreleri 96 kuyucuklu plaklara inoküle edildi.

- 24 saat boyunca adezyon ve çoğalmaları için beklenen hücrelere kimyasal bileşikler ilave edilerek 1 saat 37 °C'de inkübe edildi.
- Sonra *S. aureus*'un 24 saatlik taze kültürlerinden 1x10⁶ bakteri içeren süspansiyonlar hazırlandı.
- Bu süspansiyonlardan kimyasalların inoküle edildiği hücre kültürleri üzerine aktararak ve 3 saat 37 °C'de inkübe edildi.
- Mikroorganizmaların üreme yoğunluklarının belirlenmesi için hem absorbans ölçümü gerçekleştirildi hem de her bir kuyucuktan alınan numunelerin Mueller-Hinton agarı ekimleri yapılarak ve 24 saat 37 °C'de inkübe edildi. Koloni sayımları cfu/ml olarak hesaplandı. Kimyasal

bileşiklerin mikroorganizmalar üzerindeki etkinlikleri kantitasyon yapılarak değerlendirilmiş oldu.

3.9. Kapsaisin, Nisin ve Kumarin'in *S. aureus*'un Hücre Adezyonu ve İnvazyonu Üzerindeki Etkinliklerinin Değerlendirilmesi

Kimyasal bileşiklerin hücresel adezyon ve invazyon etkinliklerini incelemek için deneyler 12-24 kuyucuklu düz tabanlı pleytlerde gerçekleştirildi.

- Bu amaç için *S. aureus*'un Mueller-Hinton agara pasajlanan taze kültürleri kullanıldı. Bu işlemlerden önce ise Vero hücre hattı her bir ml'sinde 1×10^6 hücre olacak şekilde hazırlanmış ve en az %80 oranında kültür kabı yüzeyini kaplamış hücreler üzerine Kapsaisin, Nisin ve Kumarin non-toksik konsantrasyonlarda hücrelere inoküle edildi. İnokülasyonu takiben 2 saat 37°C 'de inkübe edildi.
- Daha sonra ise *S. aureus*'un 24 saatlik taze kültürlerinden hazırlanan 1×10^8 yoğunluktaki bakteri solüsyonu kimyasal bileşiklerle muamele edilen hücre kültür besiyerlerine ilave edildi.
- Adezyon deneylerinin sonuçlandırılması için 37°C 'de 3 saat inkübasyonu gerçekleştirildi. Pleytin kuyucuklarına PBS solüsyonu ilave edilerek nazıkçe aspire edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak hücrelerin yıkama işlemleri gerçekleştirildi.
- Adezyon tesleri için bu aşamadan sonra; hücreler 0.025% Triton X-100 ile muamele edilerek ve bu solüsyon ile en 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda hücreler ve mikroorganizmalardan oluşan karışım homojenize edilerek ve pleytin her bir kuyucuğundan alınan örnekler Mueller-Hinton agara ekimleri gerçekleştirildi. İnkübasyondan 24 saat sonra bakteri koloni sayımları gerçekleştirildi.

3.9.1. İnvazyon Deneyi

- Yukarıda bahsedildiği gibi hücre kültürlerinde Kapsaisin, Nisin ve Kumarin ile muamele bakterilerin hücrelere adezyon testleri için pleytin kuyucuklarına Gentamisin çözeltisi (200 µg/mL) hazırlanarak ilave edildi. Antibiyotik solüsyonun ilavesinden sonra kültür pleytleri 37 °C’de kısa süreliğine (yaklaşık 10 dk) inkübasyona bırakıldı. Bu süre zarfından hücre yüzeyi ve ortamdaki bakteriler inaktive edilmiş oldu.
- Ardından pleytin kuyucuklarına PBS solüsyonu ilave edilerek yukarıda adezyon deneylerinde olduğu gibi hücre yüzeyleri 3 kez yıkandı.
- Bu aşamadan sonra benzer şekilde hücrelerin üzerine 0.025% Triton X-100 ilave edilerek oda ısısında yaklaşık 5 dakika inkübe edildi.
- Kuyucuklarda oluşan lizat homojenize edilerek her bir kuyucuktan alınan örneğin Mueller-Hinton agara ekimleri yapılarak 37 °C’de 24 saat inkübasyonu takiben koloni sayımları gerçekleştirildi.

3.10. Slime Üretimi

Kapsaisin, Nisin ve Kumarin’in *S.aureus*’un slime üretimi üzerindeki etkisinin varlığı fenotipik yöntemlerden Kongo-kırmızısı yöntemiyle değerlendirildi. Bu kimyasal bileşiklere ve bu bileşiklerin farklı kombinasyonlarına maruz bırakılan bakterilerden Kongo-kırmızısı besiyerine ekim yapılarak slime üretimi slime pozitif *S.aureus* kökenleriyle karşılaştırıldı. Mikroorganizma inokülasyonunu takiben 37 °C 48 saatlik inkübasyon sonrası yapılan değerlendirmede Kongo-kırmızısı besiyerinde siyah renkte kolonilerin varlığı slime üretimi pozitif, açık renkli kolonilerin varlığı ise slime üretimi negatif olarak değerlendirildi.

3.11. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

3.11.1. RNA Ekstraksiyonu

Total RNA izolasyonu ticari kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi (ZymoResearch, USA). Nisin, Kapsaisin, Kumarin ve Mupirosin tedavi gruplarından bakteriler (*S. aureus*) ependorflara alındı ve 15.000 g x 2 dk santifrüj edildi. Supernatan atıldı ve üzerine 800 µl RNA lizis buffer eklendi. Karışım ZR BashingBead lizis tüplerine aktarıldı. Beadbeater vorteks cihazında 15 dk *S. aureus* 'un hücre duvarı parçalanması için vortekslendi. Hemen sonra santifrüje alındı ve 15.000 g x 30 sn santifrüj edildi. Santifrüj sonrası supernatandan 400 µl Zymo-spin IIICG column tüpüne aktarıldı ve altına toplayıcı tüp yerleştirilerek filtrasyon gerçekleştirmek üzere 15.000 g x 30 sn santifrüj uygulandı. Filtrasyondan altındaki toplayıcı tüpe geçen sıvı ile işlemlere devam edildi. Elde edilen sıvıya eşit hacimde %95-100 etanol karıştırıldı. Bu karışım Zymo-spin IICR column tüpüne alındı ve altında bir toplayıcı tüple 15.000 g x 30 sn santifrüj uygulandı. Bundan sonraki işlemlerde toplayıcı tüplerdeki sıvılar atıldı. Column içindeki materyale 400 µl RNA Prep Buffer eklendi ve 15.000 g x 30 sn santifrüj edildi. 700 µl RNA Wash Buffer eklendi ve 15.000 g x 30 sn santifrüj edildi. 400 µl RNA Wash Buffer ile 15.000 g x 1 dk santifrüj uygulandı. Son olarak da 50 µl DNase/RNase Free Water eklendi ve santifrüj 15.000 g x 30 sn uygulandı. RNA'ların saflık ve konsantrasyonları nükleik asit ölçer (Merinton, SMA-1000 UV Spectrophotometer, China)'de kontrol edildi. Bu adıma ek olarak, rRNA alt üniteleri (28S ve 18S) kontrol etmek için %1'lik agaroz jel hazırlanarak 100 V'da 30 dakika süreyle yürütülerek kontrol edildi. Daha sonra örnekler pellet hacimlerine göre 30-100 µl nükleaz içermeyen distile su ile sulandırılarak spektrofotometrede (Merinton, SMA-1000 UV Spectrophotometer, China) saflık ve konsantrasyonları belirlendi.

3.11.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Çalışmada genomik DNA kontaminasyonunu önlemek için DNA sindirim işlemi ticari kit yardımıyla (Abmgood, CANADA) kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi. Bu işlem sonrasında RNA örnekleri ticari kit yardımıyla (Abmgood, CANADA) kit protokolüne uygun olarak cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA eldesi; 55

°C’de 30 dakika ve 85 °C’de 5 dakika inkübe edilerek gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrasında örnek hacimleri nükleaz içermeyen su ile 200 µl olacak şekilde ayarlandı.

3.12. RT-qPCR Deneyleri

Çalışmada cDNA sentezi işlemini takiben *mecA*, *blaZ* ve internal kontrol olarak *16srRNA* genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlendi. Hedef genin amplifikasyonu her örnekten 1 µl cDNA örneği kullanılarak gerçekleştirildi. RT-qPCR analizlerinde BRYT Green boyası içeren kit (Promega, GoTaq PCR Mastermiks, USA) kullanıldı. Reaksiyon protokolü: 95 °C’de 2 dakika, 95 °C’de 15 saniye, 60 °C’de 60 saniye olarak 40 döngü şeklinde uygulandı (Anatolia Montana 4896 RT_PCR). Her örnek dublike çalışıldı ve referans gen olarak ise GAPDH geni seçildi. Kullanılan primerlerin forward ve reverse sekansları Tablo 1.’de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan oligonükleotit dizileri ve baz büyüklükleri.

Primers	Forward ve Reverse Primer Sekansları (5’-3’)	Ürün Boyutu (bp)	Referans
GAPDH	Forward TCAACGATTTAACAGATGACGCA	77	Chovanová ve ark., 2016 (192)
	Reverse TTCGTCTTTGAAACGACCTTGTG		
<i>mecA</i>	Forward TCCACCCTCAAACAGGTGAA Reverse TGGAACCTGTTGAGCAGAGGT	139	Chovanová ve ark., 2016 (192)
<i>blaZ</i>	Forward TCCTAAGGGCCAATCTGAACC Reverse ACACTCTTGGCGGTTTCACT	105	Chovanová ve ark., 2016 (192)
<i>16S rRNA</i>	Forward GGGACCCGCACAAGCGGTGG	191	Jiang ve ark., 2021 (193)
	Reverse GGGTTGCGCTCGTTGCGGGA		

16S rRNA gen bölgesi için; program ve döngü sayısı; 95 °C’de 2 dk. sonra 40 siklus olmak üzere PCR için ısı döngüsü: 95°C’de 15 sn. denatürasyon, 60°C annealing ve uzama olarak uygulandı.

MecA gen bölgesi için; program ve döngü sayısı; 95 °C’de 2 dk. sonra 40 siklus olmak üzere PCR için ısı döngüsü: 95 °C’de 15 sn. denatürasyon, 60°C annealing ve uzama olarak uygulandı.

blaZ gen bölgesi için; program ve döngü sayısı; 95 °C’de 2 dk. sonra 40 siklus olmak üzere PCR için ısı döngüsü: 95 °C’de 15 sn. denatürasyon, 60°C annealing ve uzama olarak uygulandı.

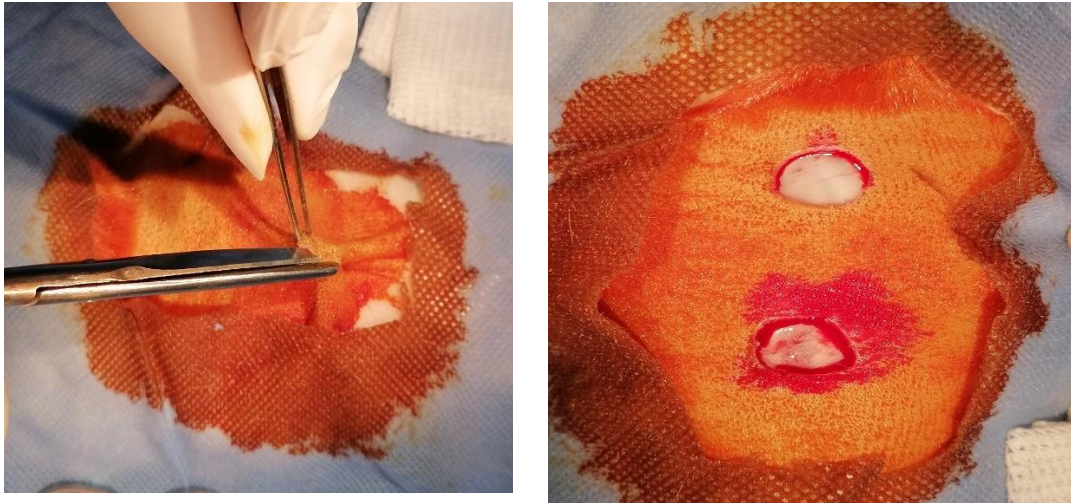
3.13. Deney Hayvanları Çalışmaları

Bu çalışma için Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 23/03/2020 tarih ve 2020/03-12 numaralı etik kurul onayı alınmıştır. Hayvan deneyleri Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde gerçekleştirildi. Deneylerde Wistar Albino türü erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar randomize olarak gruplara ayrıldı. Çalışmada tüm sıçanlar deneyler süresince standart diyet ve su ile ad libitum olarak beslendi. Sıçanlar bir grup tedavi verilmeyen kontrol olmak üzere toplamda 12 farklı gruba ayrıldı. Ayrıca 3 sıçandan oluşan 1 standart ilaç (Mupirosin) tedavi grubu da oluşturuldu.

3.13.1. Çalışma Grupları

Deney grupları aşağıda verilmiştir. Bu deneylerde kontrol gruplarıyla birlikte toplam 12 grup yer aldı. Gruplar 3 adet sıçan ile oluşturuldu (Tablo 2). Sıçanların sırt yüzeyi traşlandıktan sonra steril şartlarda her sıçanda 2 adet 1x1 cm flep kaldırılarak yara oluşturuldu (Resim 6) ve 1×10^6 bakteri inoküle edilerek yara enfekte edildi. Enfeksiyonu takiben 3.günde tüm gruplarda (kontrol grubu dışında) tedaviye başlandı.

Tablo 2. Deney grupları	Fare sayısı	Tekrar sayısı
Grup 1 (Nisin tedavi grubu)	3	2x3
Grup 2 (Kapsaisin tedavi grubu)	3	2x3
Grup 3 (Kumarin tedavi grubu)	3	2x3
Grup 4 (Kumarin artı Mupirosin tedavi grubu)	3	2x3
Grup 5 (Nisin artı Mupirosin tedavi grubu)	3	2x3
Grup 6 (Kapsaicin artı Mupirosin tedavi grubu)	3	2x3
Grup 7 (Kapsaisin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubu)	3	2x3
Grup 8 (Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubu)	3	2x3
Grup 9 Kapsaisin artı Kumarin artı Mupirosin tedavi grubu)	3	2x3
Grup 10 (Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubu)	3	2x3
Grup 11 (Mupirosin tedavi grubu)	3	2x3
Grup 12 (Kontrol grubu)	3	2x3
Toplam hayvan sayısı	36	2x36



Resim 6. Farelerde deneysel olarak oluşturulan MRSA enfekte yara dokusu.

3.13.2. Tedavi

Sıçanlar gruplara ayrıldıktan sonra sırt bölgesine 1x1 cm² lik yara oluşturuldu ve *S. aureus* ile enfekte edildi. 3 gün sonra etkin bulunan konsantrasyonlarda tedaviye başlandı ve tedavi 10 gün 2x1 şeklinde uygulandı. Yara yeri gelişimleri günlük takip edildi.

3.13.3. Tedavi Sonrası Doku Örneklerinin Değerlendirilmesi

Dekaptitasyon işlemini takiben yara örneklerinden alınan doku parçacıkları bir histopatolojik değerlendirmeler için kullanıldı.

3.13.4. Histolojik Değerlendirmeler

Tedavi sonunda sıçanlar ketamin/ksilazin (150/9 mg/kg, i.p.) ile anestezi yapıldıktan sonra doku disseksiyonları gerçekleştirildi. Projede Histolojik-Patolojik değerlendirmeler HMKÜ Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Bu aşamada yara iyileşmesi histopatolojisi değerlendirilmek üzere alınan dokular %10'luk formaldehid çözeltisi içine kondu.

Alınan organ ve dokulardan preperat hazırlamak için kasetlere yerleştirme, fiksasyon, parafin blokları oluşturma, kesit alma ve Hematoksilen-Eosin ile boyama gibi gereken tüm prosedürler ve mikroskopik inceleme işlemleri HMKÜ Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi.

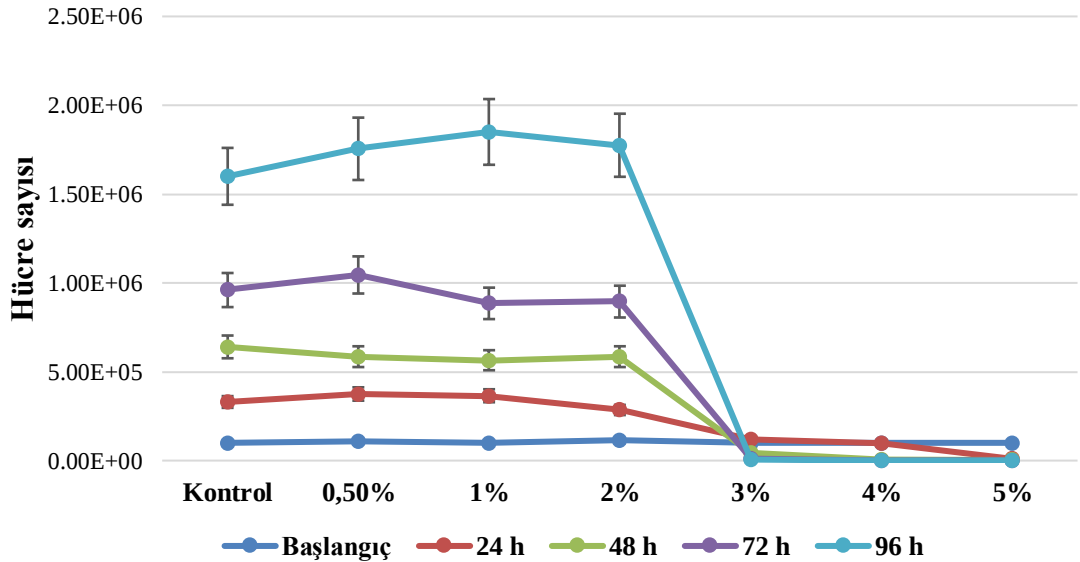
3.14. İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Windows v. 23, Chicago, IL) programı kullanılarak yapıldı. Her deney verisi tanımlayıcı istatistik analiz tablosu ile Kruskal-Wallis testi kullanılarak belirtildi. Çalışmada ikili grup verilerinin karşılaştırılmaları Mann-Whitney U kullanılarak yapıldı. Tüm analizlerde farklar $p < 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

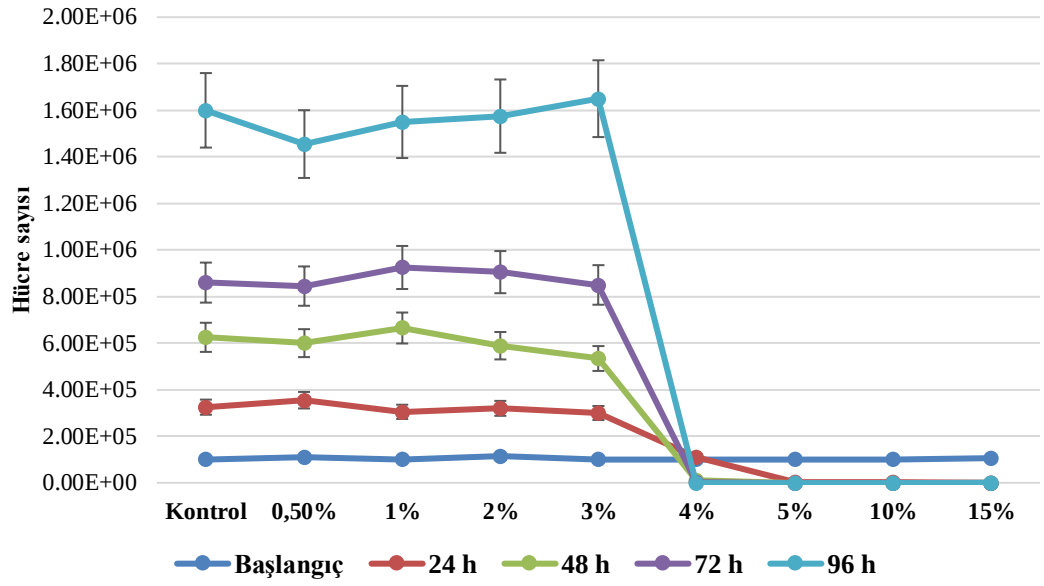
4. BULGULAR

4.1. DMSO/Etanol'ün Non-Toksik Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada Kapsaisin, Nisin ve Kumarin'in besiyerinde çözülmesi için kullanılan solventlerin (DMSO ve Etanol) hücreler üzerindeki non-toksik konsantrasyonları belirlendi. DMSO ve etanolün farklı konsantrasyonları monolayer tarzda üremiş olan Vero hücreleri (inokülasyon konsantrasyonu; 1×10^6 hücre/ml) ile muamele edildi. 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde Vero hücreleri muamele edildi. Deneylerde DMSO $\leq 2\%$ (w/v) etanol $\leq 3\%$ (w/v) konsantrasyonlarında Vero hücre üremesine, canlılığına herhangi bir toksisite oluşturmadığı hem morfolojik hem de hücre canlılığı tespitiyle gerçekleştirildi. Deneylerde fitokimyasalların besiyerinde çözülmesi amacıyla solvent olarak kullanılan hem DMSO hem de etanolün %1'lik konsantrasyonları seçildi.



Şekil 1. DMSO'nun Vero hücre hattında non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi

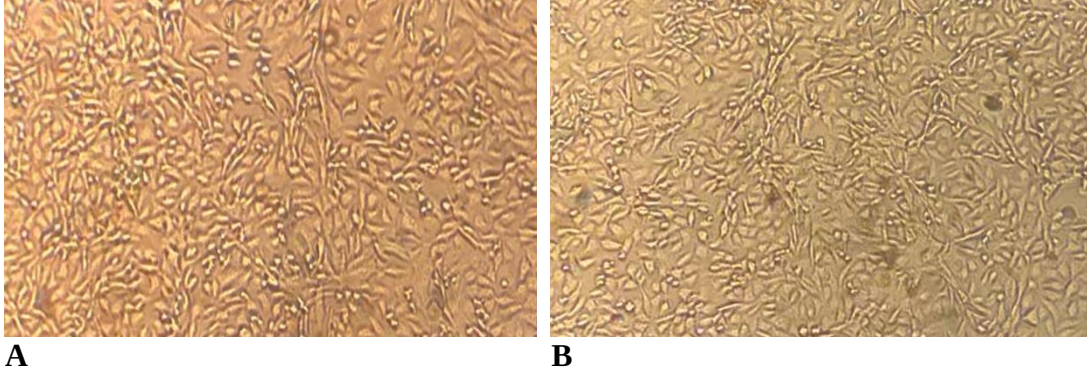


Şekil 2. Etanol'ün Vero hücre hattında non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi

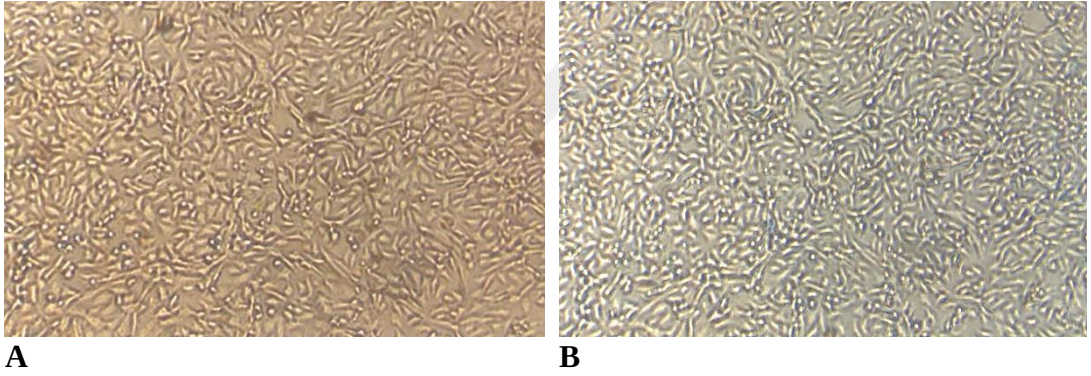
Hücre kültürü çalışmalarında %2'nin üzerindeki DMSO konsantrasyonunun inkübasyon süresine bağlı olarak hücrelerde atipik görünüm ve canlılığında da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu durum bu ve üzeri konsantrasyonların hücre proliferasyonu üzerinde etkili olabileceği, toksisite yaratabildiği şeklinde değerlendirilmiştir (Şekil 1; $p < 0.05$).

Etanol için ise %3 ve daha yüksek konsantrasyonlarda 72. saatten sonra hücrelerde morfolojik değişimler meydana gelmiş canlılıkta da istatistiksel olarak olmasa da azalma tespit edilmiştir. İnkübasyon süresi 96 saate kadar uzadığında ise hücre canlılığında anlamlı azalmaların olduğu tespit edildi (Şekil 2).

Aktivite çalışmalarında, Vero hücreleri için DMSO'nun %2 etanolün ise %3 ve daha düşük konsantrasyonlarda hücre üremesi üzerinde herhangi bir toksisite oluşturmadığı tespit edildi. Bu testlerle hücrelerin üremesi 96 saat takip edildi. Bu süre zarfında DMSO ve etanol ihtiva eden Vero hücrelerinde morfolojik olarak kontrol grubu hücreleriyle kıyaslandığında agregasyon, füzyon, piknozis gibi sitopatolojik değişimlerin oluşmadığı tespit edildi (Resim 7-11). Bunun yanında yine kontrol grubuyla kıyaslandığında 96.saat sonunda toplanan hücre canlılıklarının anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$).



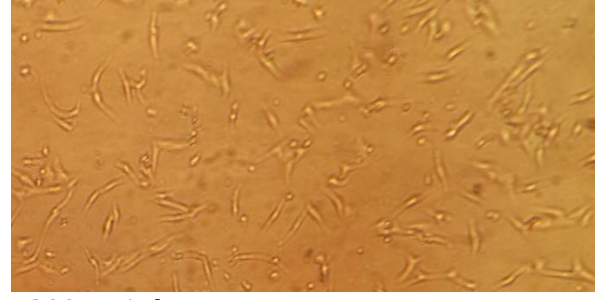
Resim 7. Vero Hücreleri. A. 96 saat inkübasyondan sonra içerisinde DMSO bulunmayan hücre kültürünün mikroskopik görüntüsü. B: İçerisinde $\leq$ %2 DMSO bulunan hücre kültürünün morfolojik görünümü (10X).



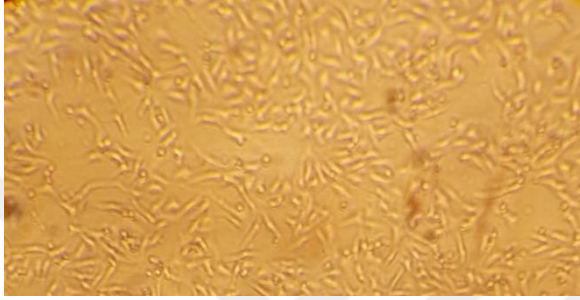
Resim 8. Vero Hücreleri. A. 96 saat inkübasyondan sonra içerisinde %70 etanol bulunmayan hücre kültürünün mikroskopik görüntüsü. B: içerisinde $\leq$ %3 etanol (%70'lik) bulunan hücre kültürünün morfolojik görünümü (10X)



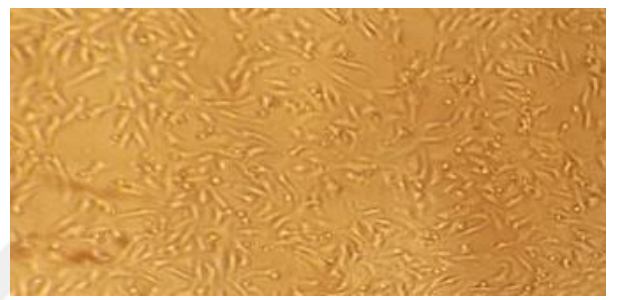
2600 $\mu\text{g/ml}$



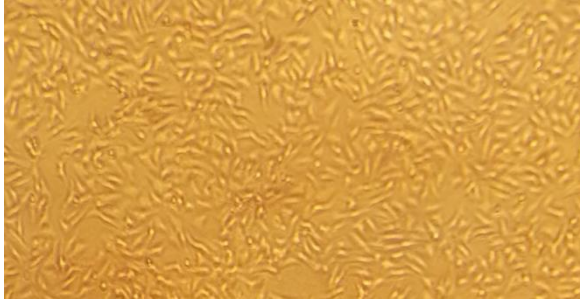
1300 $\mu\text{g/ml}$



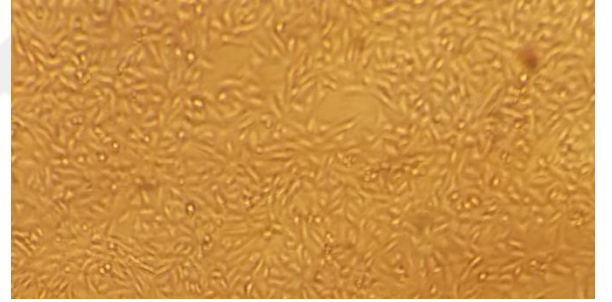
650 $\mu\text{g/ml}$



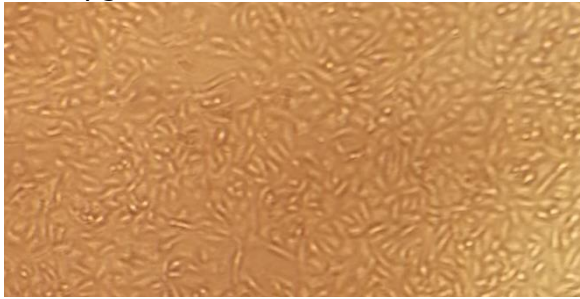
325 $\mu\text{g/ml}$



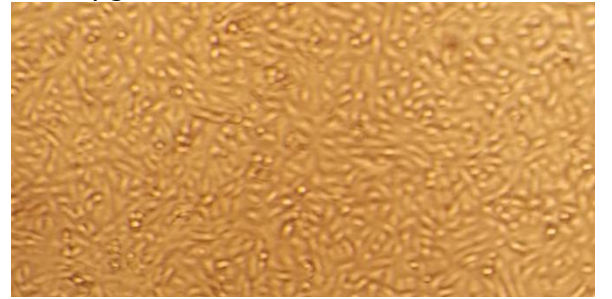
162.5 $\mu\text{g/ml}$



81.25 $\mu\text{g/ml}$



40.6 $\mu\text{g/ml}$

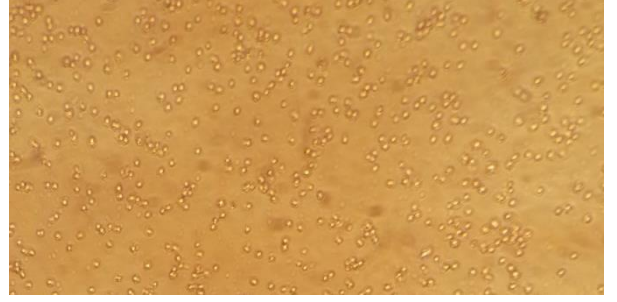


20.3 $\mu\text{g/ml}$

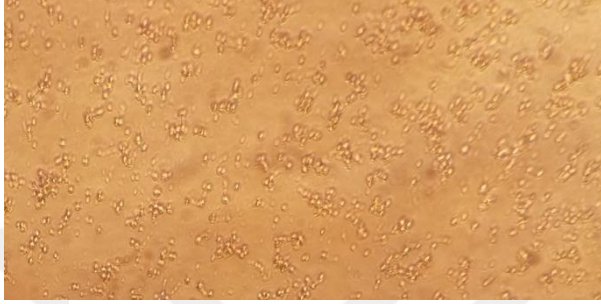
Resim 9. Vero hücreleri üzerinde inkübasyonun 96.saatinde Kumarin'in farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde etkisi (10X).



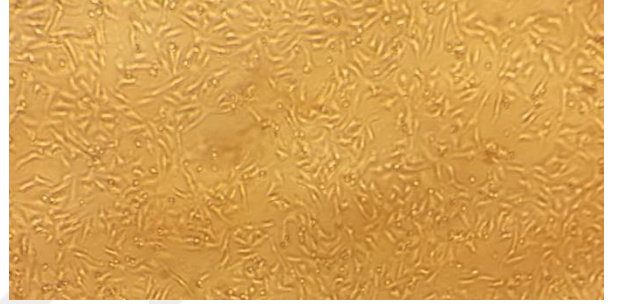
124.8 µg/ml



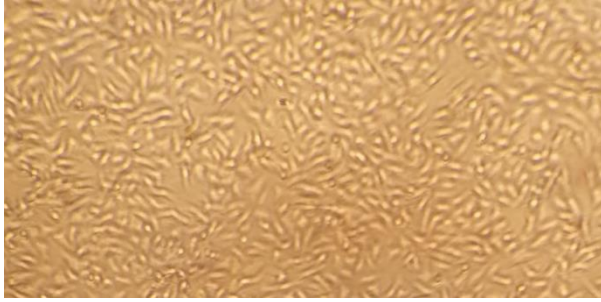
62.4 µg/ml



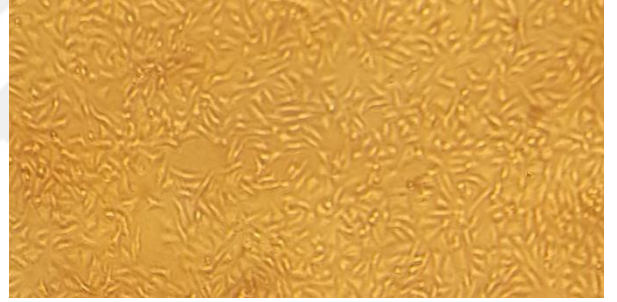
31.2 µg/ml



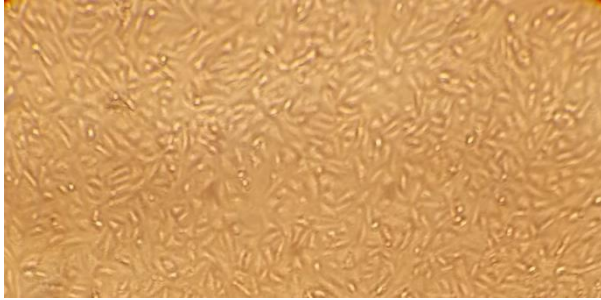
15.6 µg/ml



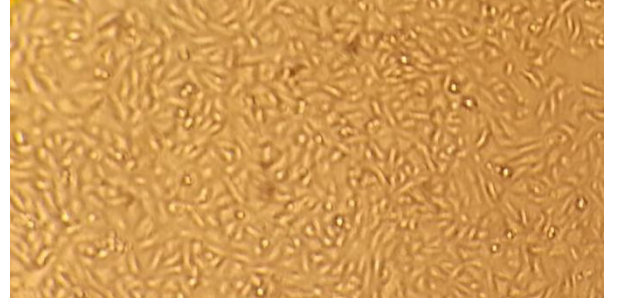
7.8 µg/ml



3.9 µg/ml

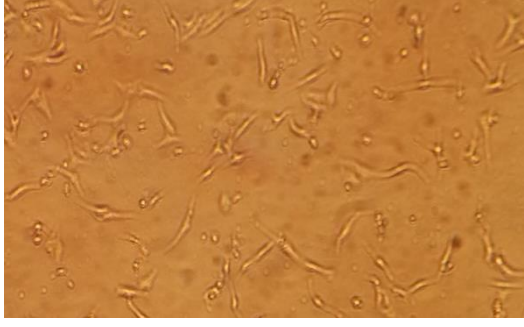


1.95 µg/ml

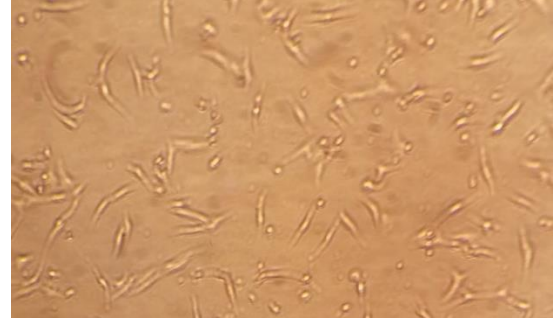


0.975 µg/ml

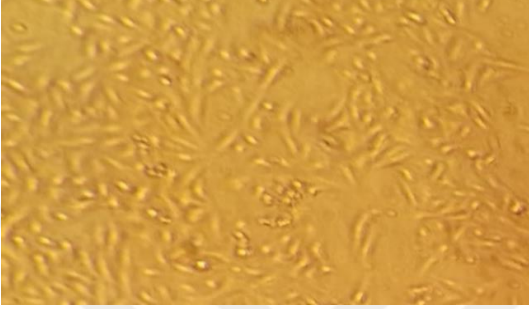
Resim 10. Vero hücreleri üzerinde inkübasyonun 96.saatinde Nisin'in farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde etkisi (10X).



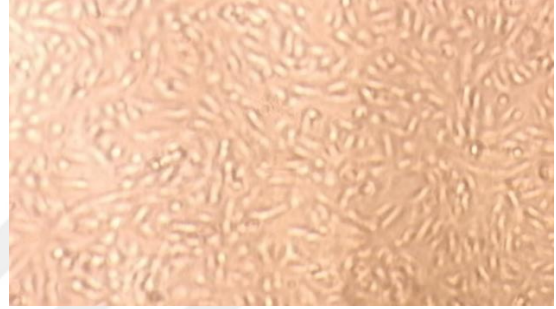
200 µg/ml



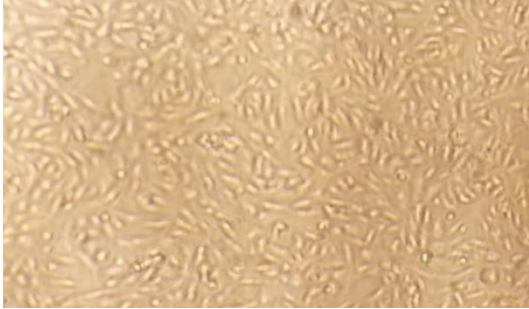
100 µg/ml



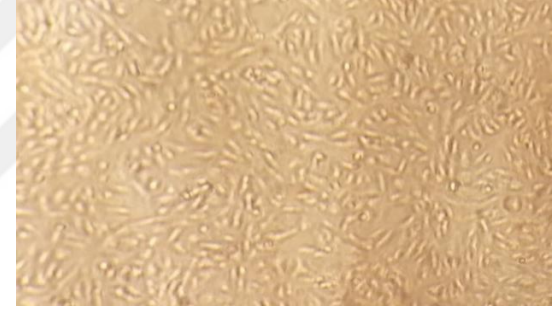
50 µg/ml



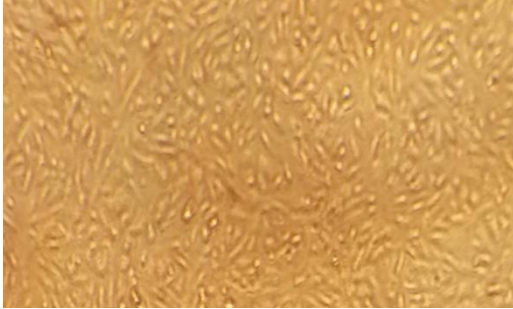
25 µg/ml



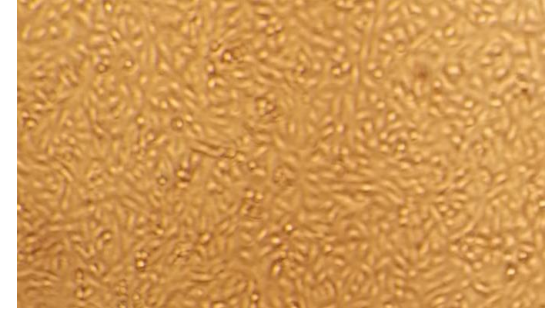
12.5 µg/ml



6.25 µg/ml



3.125 µg/ml



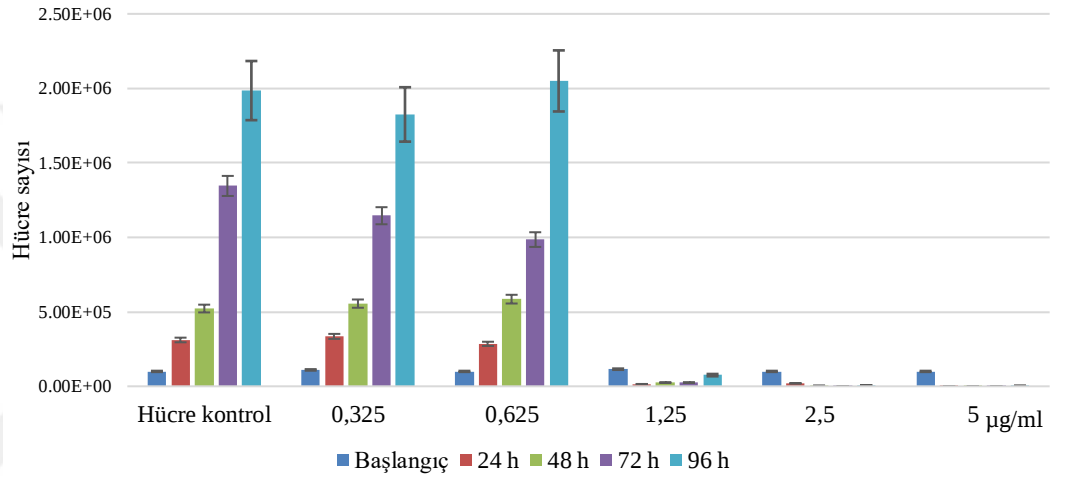
1.562 µg/ml

Resim 11. Vero hücreleri üzerinde inkübasyonun 96.saatinde Kapsaisin'in farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde etkisi (10X).

4.2. MTT Sonuçları

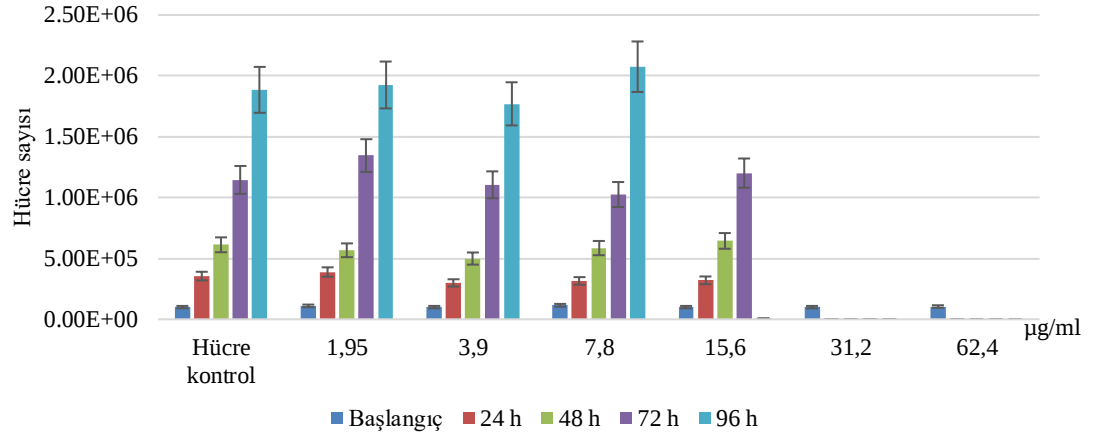
Kapsaisin, Nisin ve Kumarin'in Vero hücre hattında sitotoksikite testlerinin yapıldığı bu yöntemde deneyler 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroyuvarlar kullanılarak

gerçekleştirildi. Hücreler (1×10^6 hücre/ml konsantrasyonda) inoküle edildikten sonra karbondioksitli etüvde 37°C 'de 8 saat inkübe edilerek hücrelerin metabolik fonksiyonlarını düzenlemelerine imkan sağlandı. Metabolik fonksiyonlarını düzenleyen hücrelerin kültür medyumuna içerisine kültür medyumuna ile dilüe edilen farklı konsantrasyonlardaki kimyasallar eklenerek 96 saat inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonunda spektrofotometre 570 nm dalga boyunda okutularak Kapsaisin, Nisin ve Kumarin'in non-toksik konsantrasyonları belirlendi (Şekil 3-6).

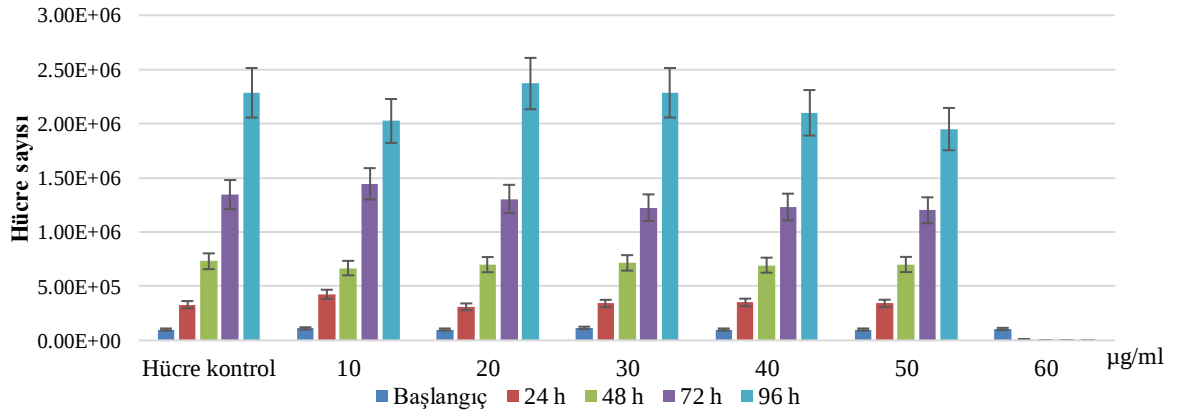


Şekil 3. Mupirosin'in Vero hücre kültüründe non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.

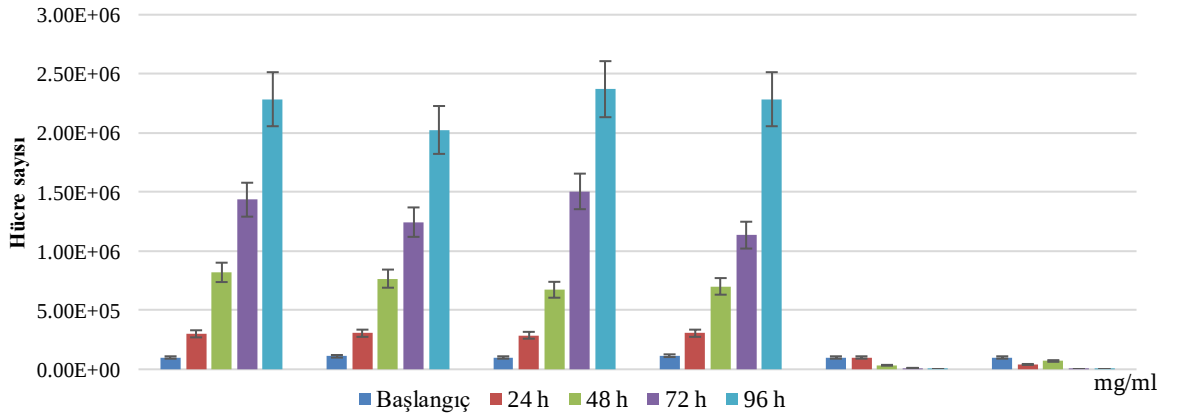
Şekil 3'te Mupirosin'in Vero hücre kültüründe non-toksik konsantrasyonu ile ilgili test sonuçları görülmektedir. Şekil 3'ten de anlaşılacağı gibi 0.625 µg/ml düzeyinde ve daha düşük konsantrasyonlarda Mupirosin hücrelerde herhangi bir toksisite meydana getirmemiştir. Benzer şekilde Nisin, Kapsaisin ve Kumarin de Vero hücreleri üzerinde non-toksik konsantrasyonları belirlenmiş olup Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in non-toksik konsantrasyonları sırasıyla 15,6 µg/ml, ≤ 50 µg/ml, ve $\leq 0,65$ mg/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 4-6).



Şekil 4. Nisin'in Vero hücre kültüründe non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.

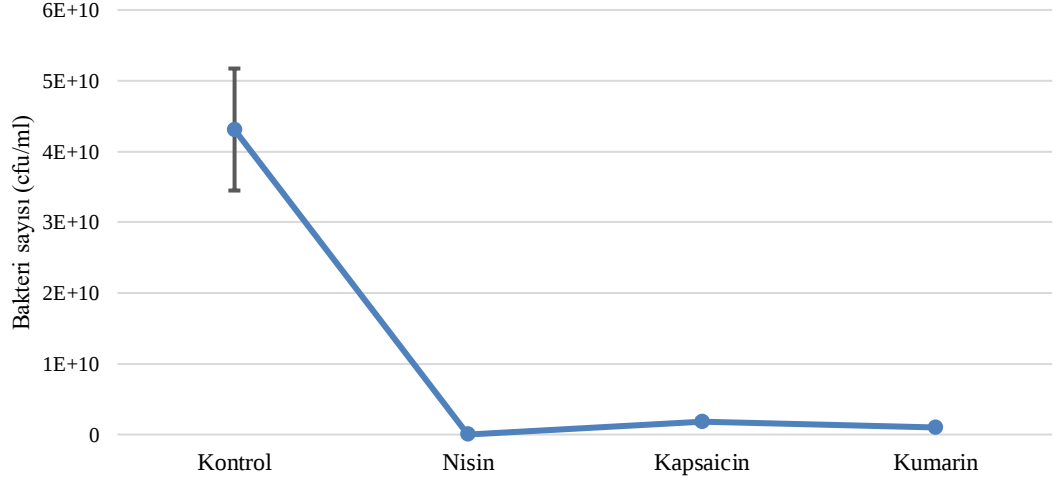


Şekil 5. Kapsaisin'in Vero hücre kültüründe non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.



Şekil 6. Kumarin'in Vero hücre kültüründe non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.

4.3. Nisin, Kapsaisin, Kumarin'in Antibakteriyel Etkinliklerinin Değerlendirilmesi

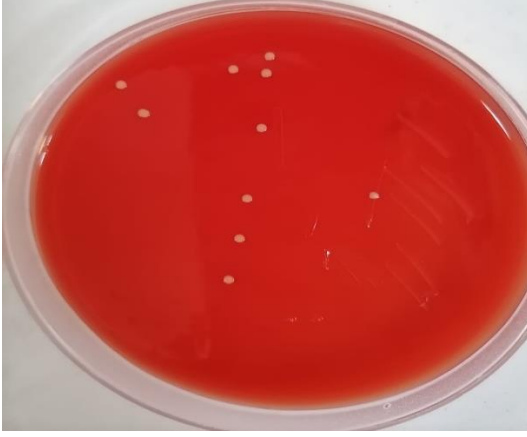


Şekil 7. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkinliği.

P değerleri

Kontrol&Nisin: p=0.037 Kontrol&Kapsaisin p=0.048 Kontrol&Kumarin p=0.046

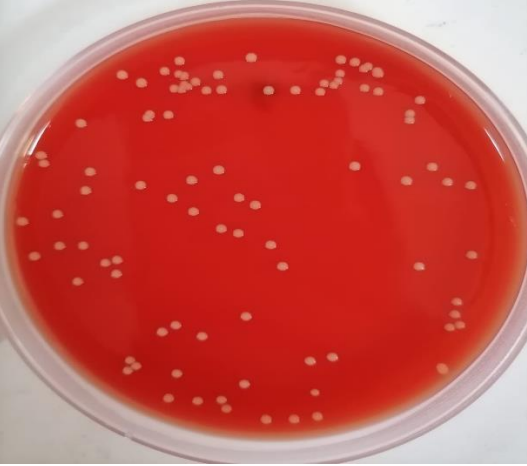
Antibakteriyel etkinlik çalışmalarında Nisin, Kapsaisin, Kumarin ve bu bileşiklerin farklı kombinasyonlarının *S. aureus*'a karşı etkinlikleri incelendi. Şekil 7'de non-toksik konsantrasyonlar dahilinde Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in *S. aureus*'un üremesi üzerinde etkinliği kontrol grubuyla kıyaslı olarak verilmiştir. Deneylerde en güçlü antibakteriyel etkinlik sırasıyla Nisin, Kumarin ve Kapsaisin olarak tespit edilmiştir (Resim 12-16). Kontrol grubuyla kıyaslandığında her üç komponentin de istatistiksel olarak anlamlı derecede *S. aureus*'un üremesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 7).



Resim 12. Nisin'in *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkinliği, 1/100 dilüsyon



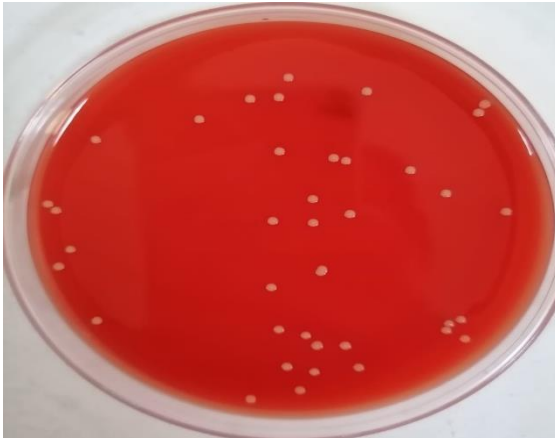
Resim 13. Kapsaisin'in *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkinliği, 1/1000 dilüsyon



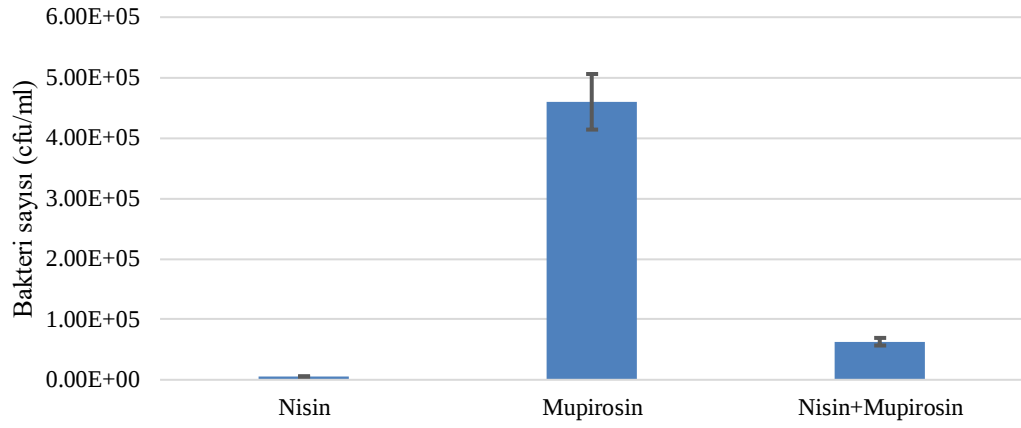
Resim 14. Kumarin'in *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkinliği, 1/1000 dilüsyon



Resim 15. Kontrol grubu, 1/1000 dilüsyon



Resim 16. Mupirosin'in *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkinliği, 1/1000 dilüsyon



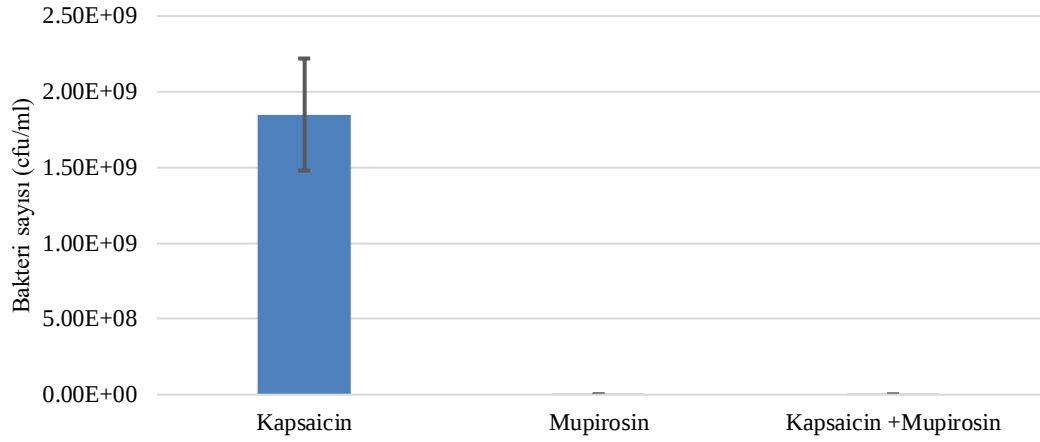
Şekil 8. *S. aureus*'a karşı Nisin'in etkinliğinin Mupirosin ile kıyaslanması.

P değerleri

Mupirosin&Nisin: p=0.042 Mupirosin&Nisin artı Mupirosin p=0.046

Şekil 8,9,10'da Nisin, Kapsaisin ve Kumarin gruplarının Mupirosin grubuyla *S.aureus*'a karşı etkinliklerinin karşılaştırılması verilmiştir.

Nisin'in etkinliğinin *S. aureus*'a karşı standart ilaç olarak seçilen Mupirosin ile kıyaslandığı deneylerde Nisin tedavi grubunda bakteri sayısının Mupirosin tedavi grubundaki bakteri sayılarından istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu tespit edildi. *S. aureus* bakteri kantitasyonu dikkate alındığında Nisin'in Mupirosin ile kombine kullanımının tek başına Mupirosin'in *S. aureus*'a etkinliğinden anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 8; P=0.046).



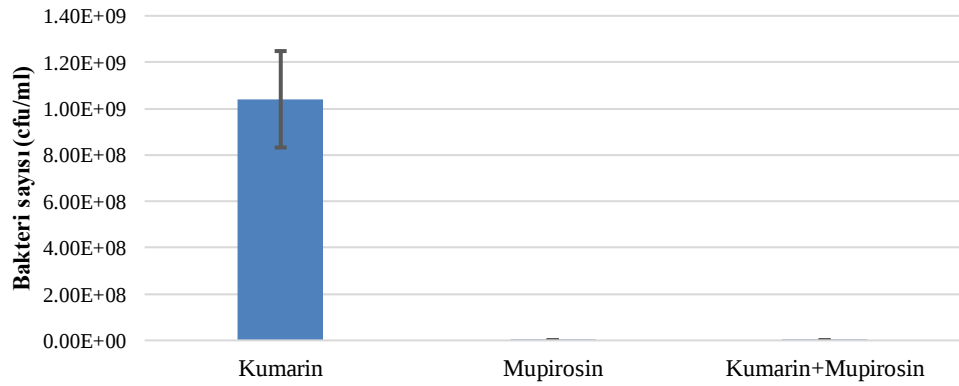
Şekil 9. Kapsaisin'in *S. aureus*'a karşı Mupirosin ile etkinliğinin kıyaslanması.

P değerleri

Mupirosin&Kapsaisin: p=0.042

Kapsaisin&Kapsaisin artı Mupirosin: p=0.042

Kapsaisin'in etkinliği Mupirosinle kıyaslandığında yalnız Kapsaisin'in etkinliğinin hem Mupirosin hem de Kapsaisin artı Mupirosin kombinasyonunun etkinliği ile kıyaslandığında çok düşük düzeyde kaldığı tespit edildi (Şekil 9; P=0.037).



Şekil 10. Kumarin'in *S. aureus*'a karşı Mupirosin ile etkinliğinin kıyaslanması.

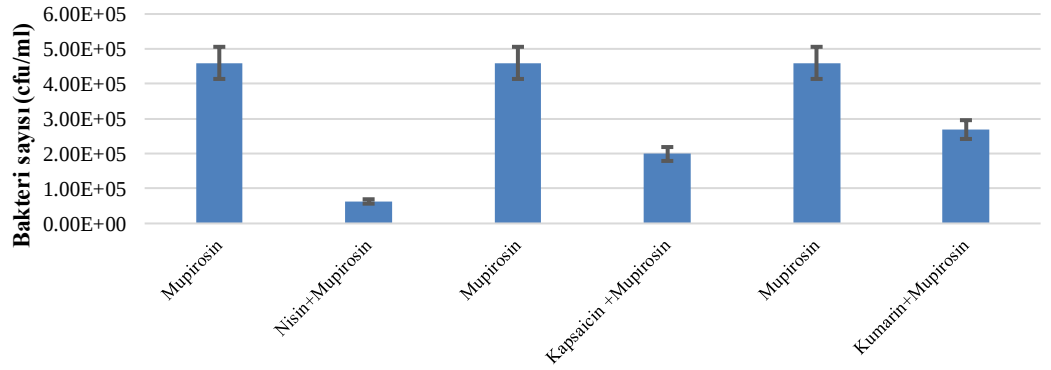
P değerleri

Mupirosin&Kumarin: p=0.042

Kumarin&Kumarin artı Mupirosin: p=0.042

Kapsaisin tedavi grubunda olduğu gibi Kumarin'in *S. aureus*'a karşı in-vitro etkinliğini araştırdığımız deneylerde tek başına Kumarin etkinliğinin Mupirosin ve

Kumarin artı Mupirosin etkinliğinden anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi (Şekil 10; P=0.042).



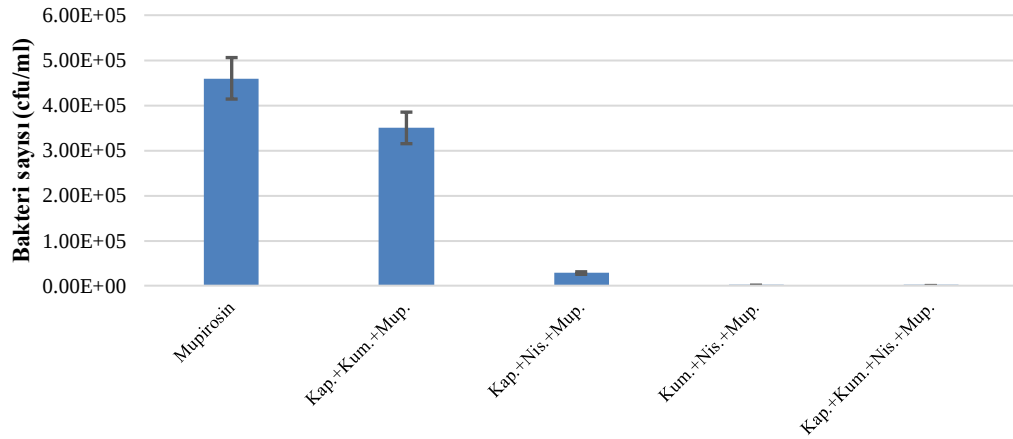
Şekil 11. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in *S. aureus*'a karşı Mupirosin ile kombine etkinliklerinin değerlendirilmesi

P değerleri

Mupirosin&Nisin artı Mupirosin: p=0.046	Mupirosin&Kapsaisin artı Mupirosin: p=0.049	Mupirosin&Kumarin artı Mupirosin: p=0.049
--	--	--

Şekil 11 ve 12'de kombinasyon gruplarının Mupirosin grubuyla *S.aureus*'a karşı etkinliklerinin karşılaştırılması verilmiştir.

Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in Mupirosin ile kombine edilerek ya da farklı kombinasyonlarının *S. aureus*'a karşı etkinliklerinin değerlendirilmesi de yapılmıştır. Şekil 11'de görüldüğü gibi Nisin artı Mupirosin, Kapsaisin artı Mupirosin ve Kumarin artı Mupirosin kombinasyonları Mupirosin'in etkinliği ile karşılaştırıldı. Her üç grup da istatistiksel olarak anlamlı derecede kombinasyonların daha yüksek düzeyde etkili olduğu saptanmış olup en güçlü kombine etkinlik sırasıyla Nisin artı Mupirosin, Kapsaisin artı Mupirosin ve Kumarin artı Mupirosin kombine tedavi gruplarında tespit edildi (Şekil 11).



Şekil 12. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in *S. aureus*'a karşı Mupirocin ile kombine etkinliklerinin değerlendirilmesi.

P Değerleri

Mupirocin&Kapsaisin
artı Kumarin artı
Mupirocin: p=0.184

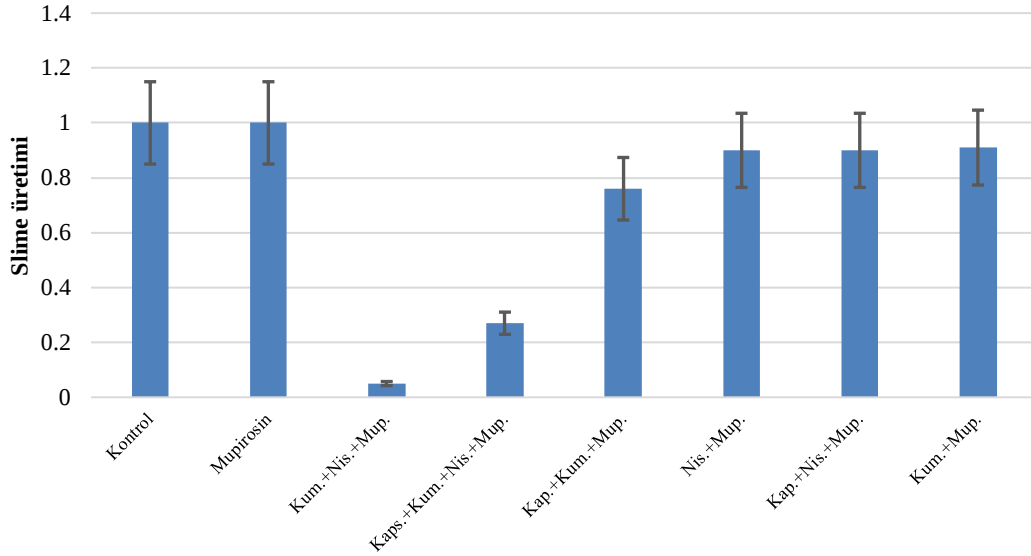
Mupirocin&Nisin
artı Kumarin artı
Mupirocin :
p=0.046

Mupirocin&Kapsaisin
artı Nisin artı
Mupirocin: p=0.049

Mupirocin&Nisin
artı Kapsaisin artı
Kumarin artı
Mupirocin :
p=0.046

Şekil 12'de görüldüğü gibi kombinasyonlarda komponent sayısı üç ve dört olarak uygulandığında antibakteriyel etkinliğin de arttığı komponentlerin güçlü sinerjizm oluşturdıkları tespit edildi. Üçlü ya da dörtlü kombinasyonlarda etkinliğin ikili kombinasyonlara kıyasla Mupirocin'in etkinliğinden anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Deneylerde Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirocin kombinasyonun *S. aureus*'a karşı en potent etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 12).

4.4. Nisin, Kapsaisin, Kumarin'in *S.aureus*'un Slime(Biyofilm) Üretme Özelliğine Etkisi



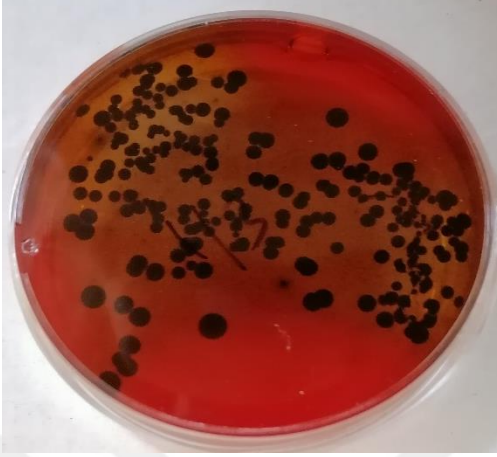
Şekil 13. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in *S. aureus*'un slime oluşturma kapasitesi üzerindeki etkinliklerinin karşılaştırılması.

P Değerleri

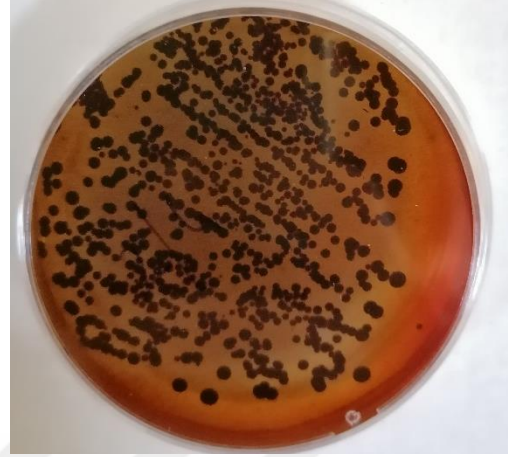
Kontrol&Kumarin artı Nisin artı Mupirosin	p<0.01
Kontrol&Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin	p<0.01
Mupirosin&Kumarin artı Nisin artı Mupirosin	p<0.01
Mupirosin&Kapsaisin artı Nisin artı Kumarin artı Mupirosin	p<0.01

Deneylerde Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in *S. aureus*'un en önemli patojenite faktörlerinden biri olarak gösterilen slime üretme kapasitesi üzerindeki etkinlikleri de kontrol grubuyla ve Mupirosin ile karşılaştırıldı (Resim17-22). Şekil 13'te kontrol ve Mupirosin tedavi grubunda bakterilerde slime üretimi tüm denemelerde pozitif olarak tespit edilirken, Mupirosin'in Nisin, Kapsaisin ve Kumarin ile kombine kullanımları durumunda *S. aureus* kökenlerinde slime üretiminin anlamlı düzeyde azalmalar gösterdiği tespit edildi. Slime oluşumunu önleyen en iyi kombinasyon Kumarin artı Nisin artı Mupirosin kombinasyonu olup Kontrol grubu ve Mupirosin grubuna göre anlamlı derecede slime üretme kapasitesinde azalmalar olduğu bu azalmanın benzer şekilde Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubunda da görüldüğü tespit edildi. Bunun yanında diğer kombinasyonlarla tedavi gruplarında ise bakterinin

slime üretme kapasitesinde kontrol ve Mupirosin grubuyla kıyaslandığında bir azalma söz konusu olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 13).



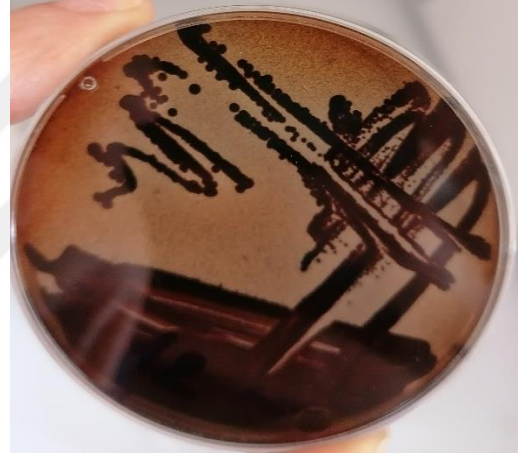
Resim 17. Slime üretimi, Nisin grubu.



Resim 18. Slime üretimi, Kapsaisin grubu.



Resim 19. Slime üretimi, Kumarin grubu.



Resim 20. Slime üretimi, kontrol grubu.

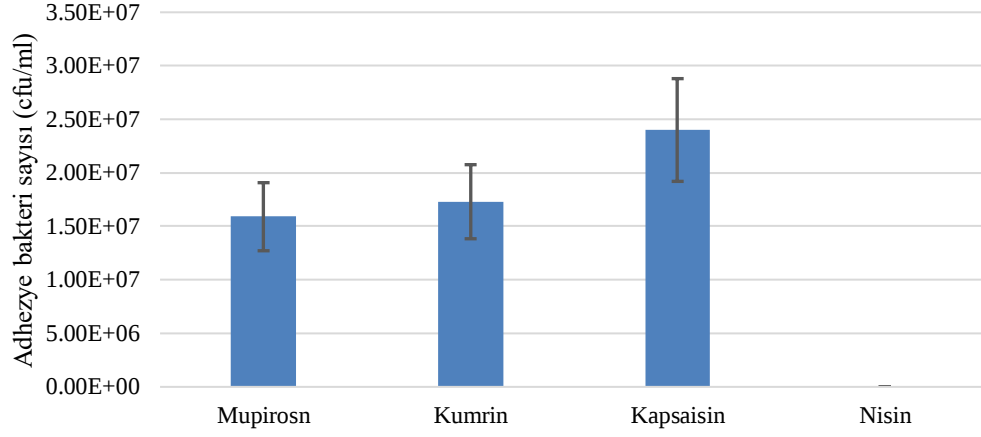


Resim 21. Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin kombine tedavi grubunun slime üretimi üzerindeki etkisi.



Resim 22. Kumarin artı Nisin artı Mupirosin kombine tedavi grubunun slime üretimi üzerindeki etkisi.

4.5. Nisin, Kapsaisin, Kumarin'in *S.aureus*'un Hücre Adezyon ve İnvazyonuna Etkisi

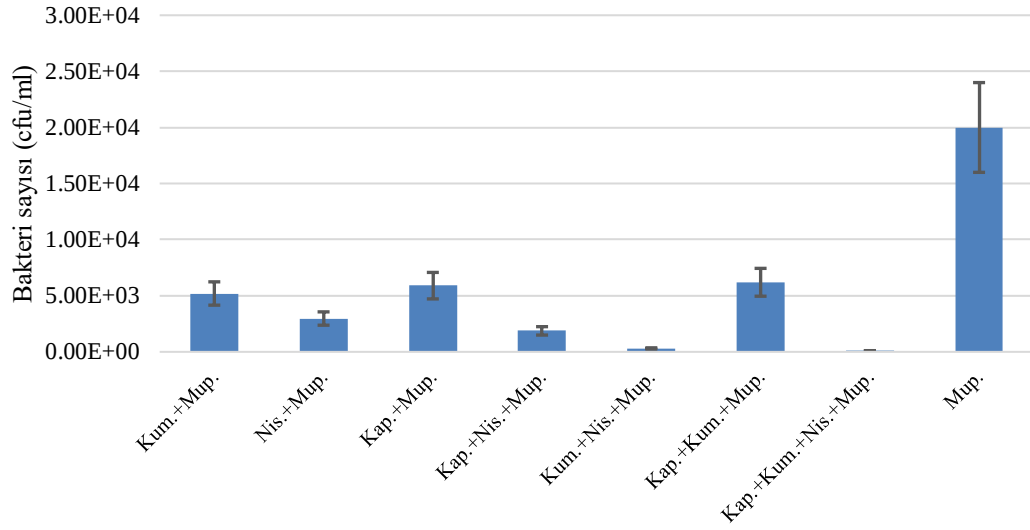


Şekil 14. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in Vero hücrelerine adezyon sonuçlarının Mupirosin grubuyla kıyaslanması.

P değerleri

Mupirosin&Nisin: P=0.037 Mupirosin&Kapsaisin: P=0.537 Mupirosin&Kumarin: P=0.827

Şekil 14'te Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in Vero hücreleri üzerinde hücre adezyonuna karşı etkinlikleri görülmektedir. Kapsaisin ve Kumarin'in etkinliği Mupirosin'in etkinliğinden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmazken, Nisin'in etkinliği Mupirosin ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde *S.aureus*'un hücre adezyonunu inhibe ettiği tespit edildi (Şekil 14).

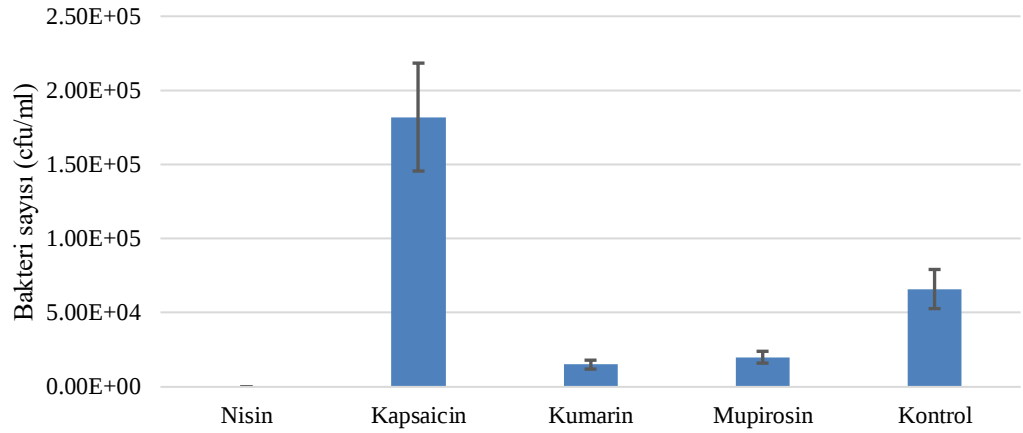


Şekil 15. Nisin, Kapsaisin, Kumarin ve farklı kombinasyonlarının *S. aureus*'un hücre adezyonu üzerindeki etkilerinin Mupirosin ile kıyaslanması.

P Değerleri

Mupirosin&Kumarin artı Mupirosin	p=0.827
Mupirosin&Nisin artı Mupirosin	p=0.049
Mupirosin&Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin	p=0.049
Mupirosin&Kapsaisin artı Nisin artı Kumarin artı Mupirosin	p=0.037
Mupirosin &Kumarin artı Nisin artı Mupirosin	p=0.046
Mupirosin&Kapsaisin artı Kumarin artı Mupirosin	p=0.658

Kimyasal bileşikler Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in farklı kombinasyonlarının ve hem Mupirosin hem de kendi aralarındaki kombinasyonlarının *S. aureus*'un hücre adezyonu üzerindeki etkinlikleri Şekil 15'te görülmektedir. Burada en güçlü aktivite Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubunda elde edilirken bunu Kumarin artı Nisin artı Mupirosin, Kapsaisin artı Nisin artı Mupirosin kombinasyonlarının takip ettiği gösterilmiştir. Ayrıca Nisin artı Mupirosin kombinasyonu *S. aureus* adezyonunu Mupirosine kıyasla anlamlı derecede inhibe ettiği gösterilmiştir (Şekil 15, p=0.049).

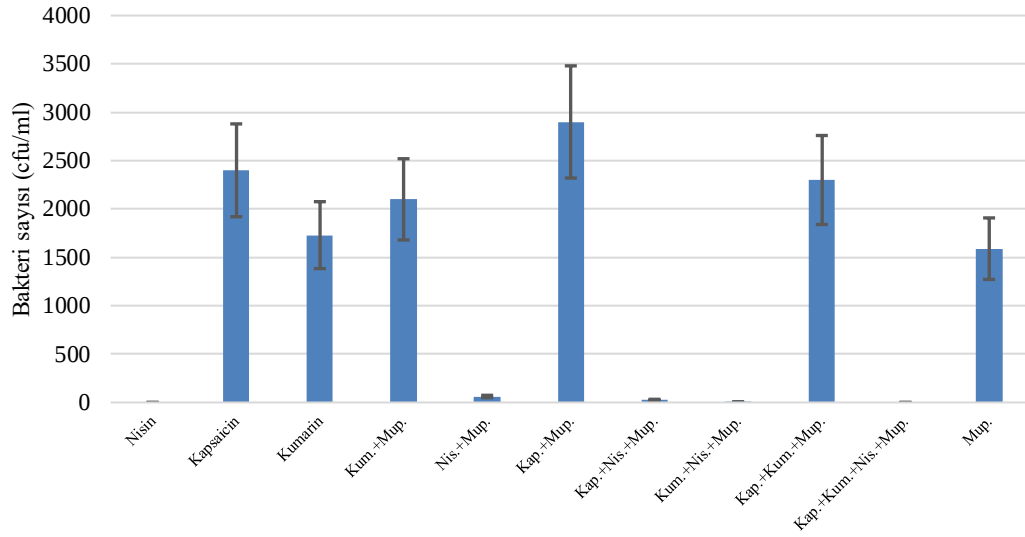


Şekil 16. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in Vero hücrelerine invazyon sonuçlarının Mupirosin ve kontrol grubuyla kıyaslanması.

P değerleri

Kontrol&Kumarin: p=0.083	Kontrol&Nisin: p=0.014	Kontrol&Kapsaisin:p=0.021
Kontrol&Mupirosin: p=0.149	Mupirosin&Kumarin:p=0.468	Mupirosin&Nisin:p=0.014
Mupirosin&Kapsaisin:p=0.021		

Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in, Mupirosin ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığı *S. aureus*'un hücrelere invazyon yeteneği üzerindeki etkinlikleri Şekil 16' da verilmiştir. *S. aureus*'un invazyonunda en etkili molekülün Nisin ve Kumarin olduğu tespit edilirken Kapsaisin'in hücresel invazyonu etkilemediği tespit edildi. Nisin'in etkinliği Mupirosinden anlamlı derecede daha güçlü idi ($p=0.014$). Kumarin'in etkinliği ise Mupirosin'in etkinliğinden daha güçlü olmasına rağmen anlamlı derecede farklı değildi (Şekil 16).



Şekil 17. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin ve farklı kombinasyonlarının *S. aureus*'un hücre invazyonu üzerindeki etkinlikleri.

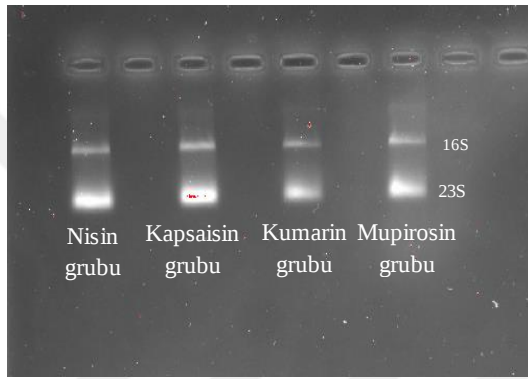
P Değerleri

Mupirosin&Nisin	p=0.014
Mupirosin&Kumarin artı Nisin artı Mupirosin	p=0.021
Mupirosin&Kapsaisin artı Nisin artı Mupirosin	p=0.021
Mupirosin&Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin	p=0.020
Mupirosin&Nisin artı Mupirosin	p=0.021

Şekil 17’de de Nisin, Kapsaisin ve Kumarin’in tek ve kombine etkinliklerinin standart ilaçla karşılaştırmalı olarak *S. aureus*’un hücre invazyonu üzerindeki etkinlikleri verilmiştir. Grafikten de anlaşılacağı üzere Nisin tedavi grubunda, Nisin artı Mupirosin, Kapsaisin artı Nisin artı Mupirosin, Kumarin artı Nisin artı Mupirosin ve Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi gruplarında hücresel invazyon inhibisyonu Mupirosin’in etkinliğinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha güçlü olduğu saptandı (Şekil 17, $P<0.05$).

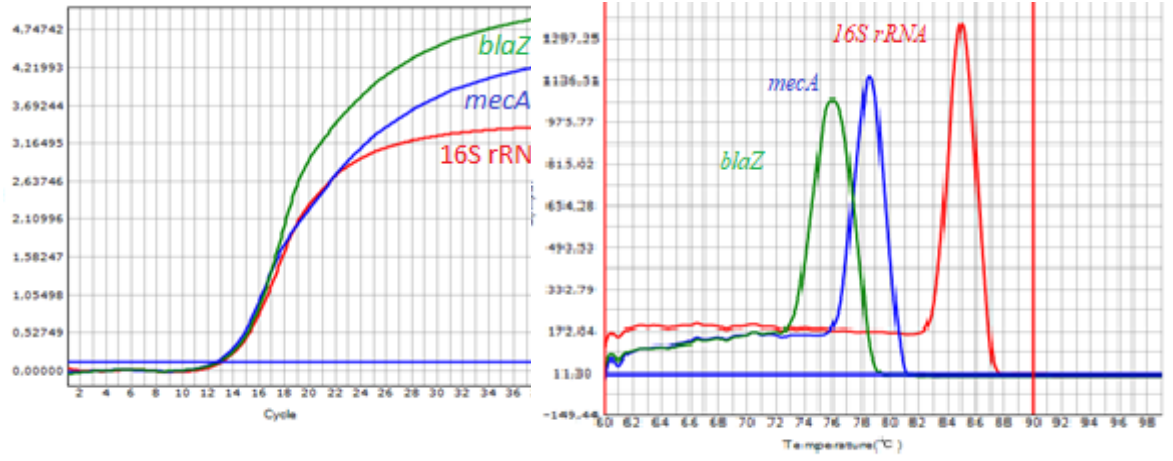
4.6. Real-Time PCR Sonuçları

Fitokimyasallar (Nisin, Kapsaisin, Kumarin) ve standart ilaçla (Mupirosin) muamele edilen *S. aureus* bakterileri inkübasyon sonunda *mecA*, *blaZ* ve *16S rRNA* genlerinin ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi için RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA aşamasına geçmeden önce her grup hücreden izole edilen RNA konsantrasyonu optimize edildi ve jel elektroforezinde yürütülerek kontrolleri gerçekleştirildi (Resim 23). Yeterli konsantrasyonlarda RNA izolasyonu yapılan hücrelerde daha sonra cDNA sentezleri gerçekleştirildi.

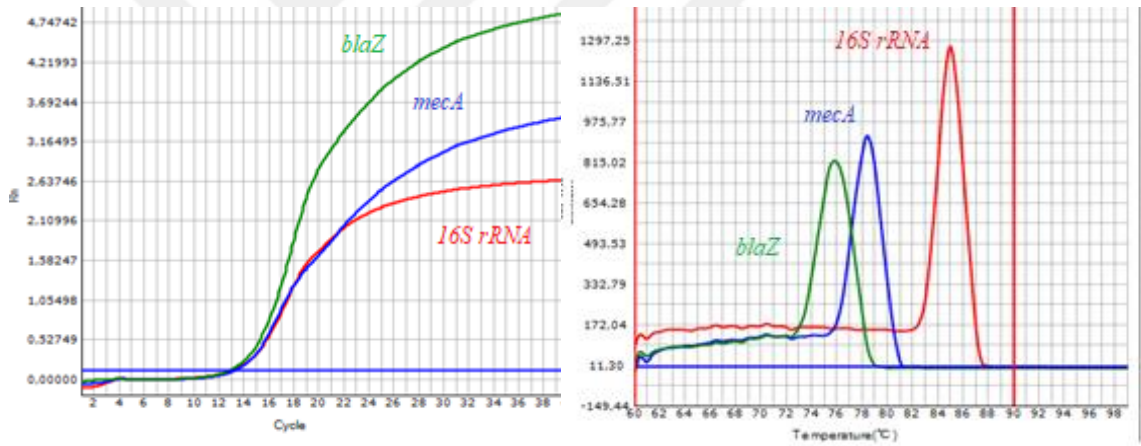


Resim 23. RNA izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

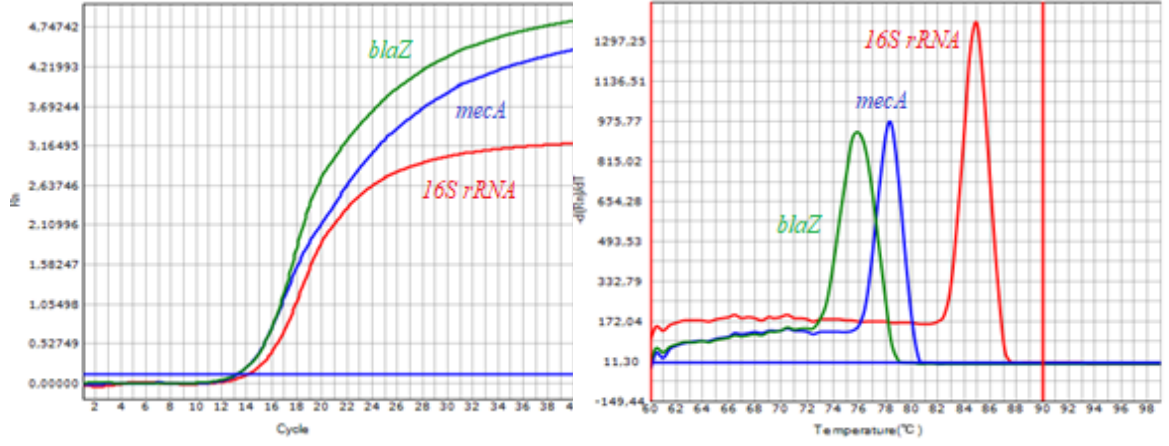
RNA izolasyonu sonrası örneklerin saflık, konsantrasyon ve kalite bakımından cDNA dönüşümü için uygun olduğu tespit edildi. RT-qPCR reaksiyonu ile elde edilen Ct ve “melting curve” (erime eğrisi) grafikleri Resim 24-31’de verilmiştir.



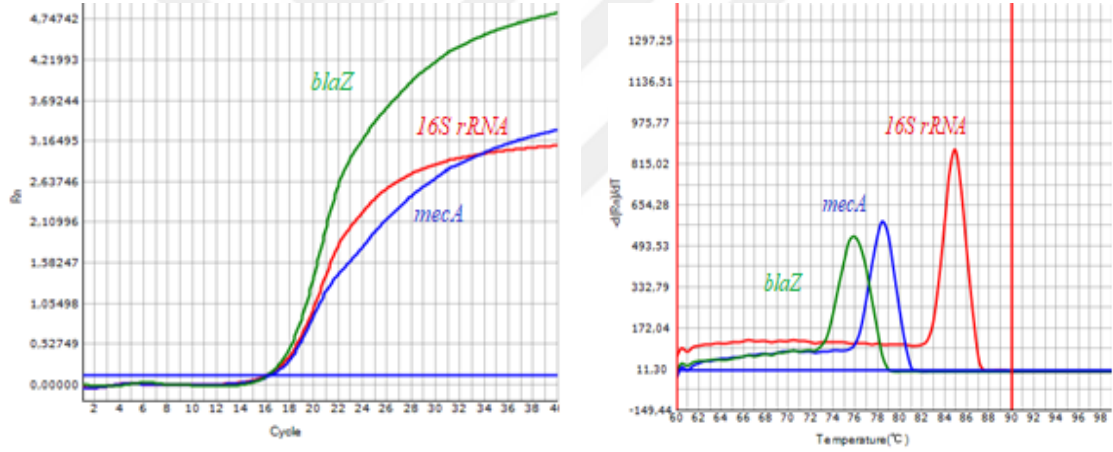
Resim 24. Nisin’in Real-Time PCR amplifikasyonu ve “melting curve” grafiği.



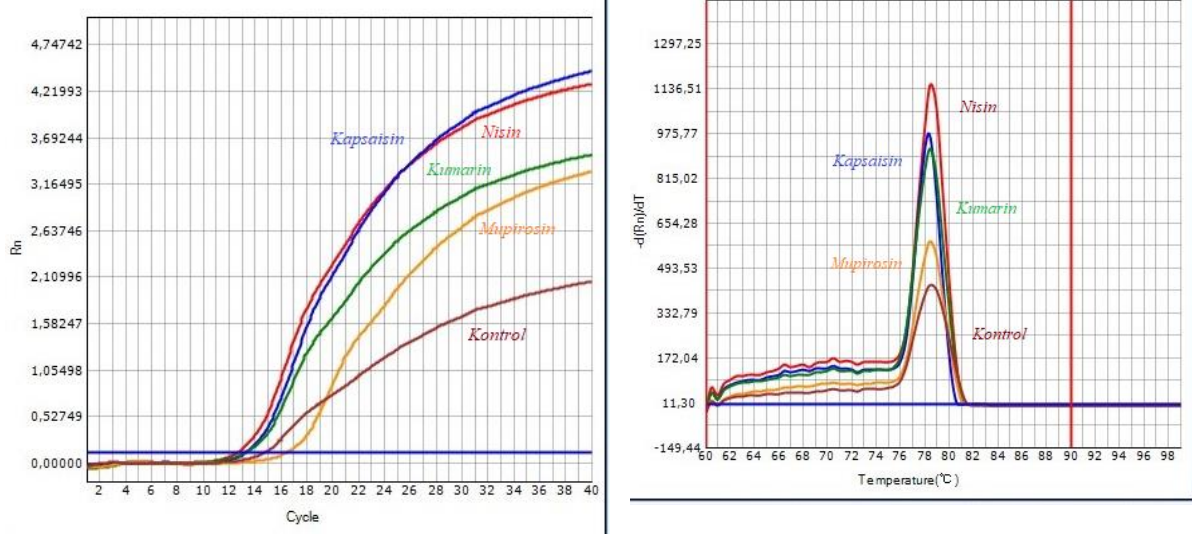
Resim 25. Kumarin’in Real-Time PCR amplifikasyonu ve “melting curve” grafiği.



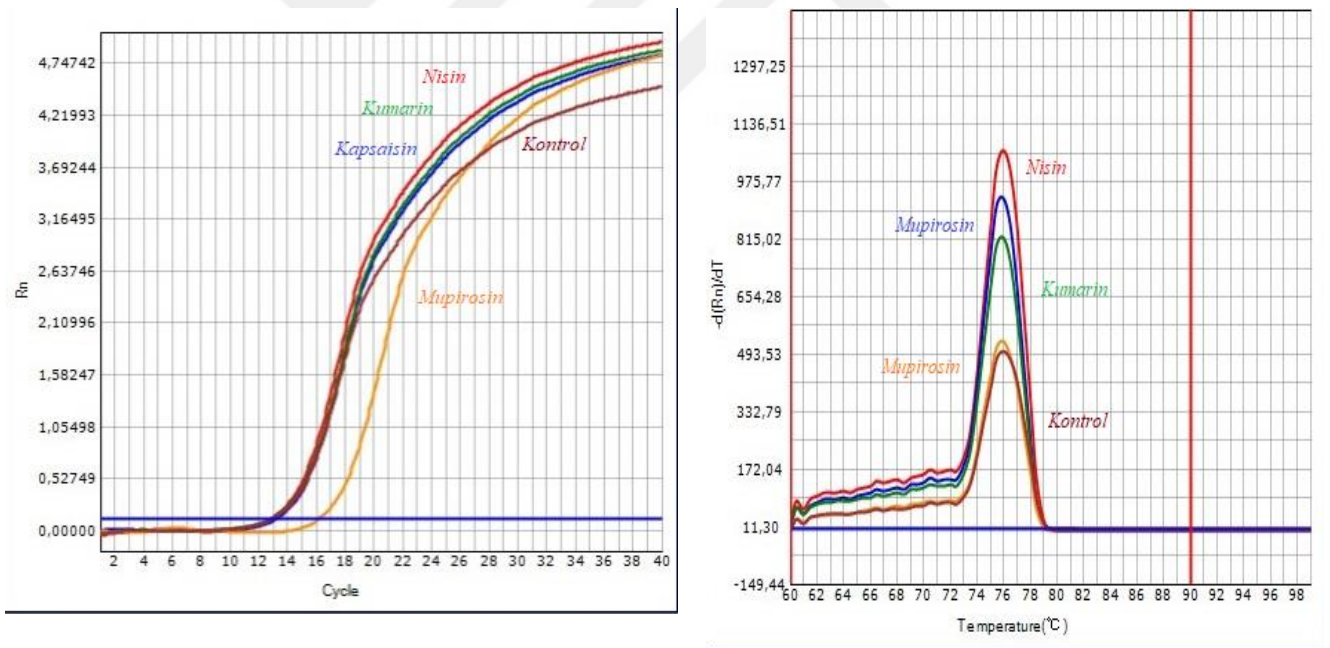
Resim 26. Kapsaisin'in Real-Time PCR amplifikasyonu ve “melting curve” grafiği.



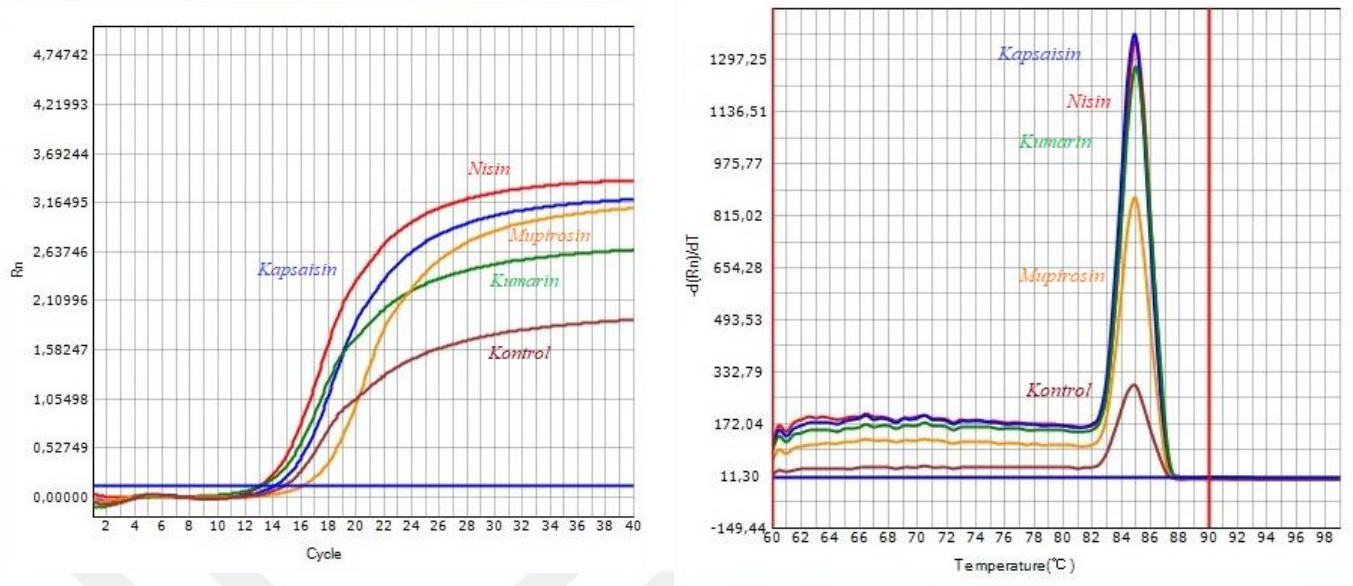
Resim 27. Mupirosin'in Real-Time PCR amplifikasyonu ve “melting curve” grafiği.



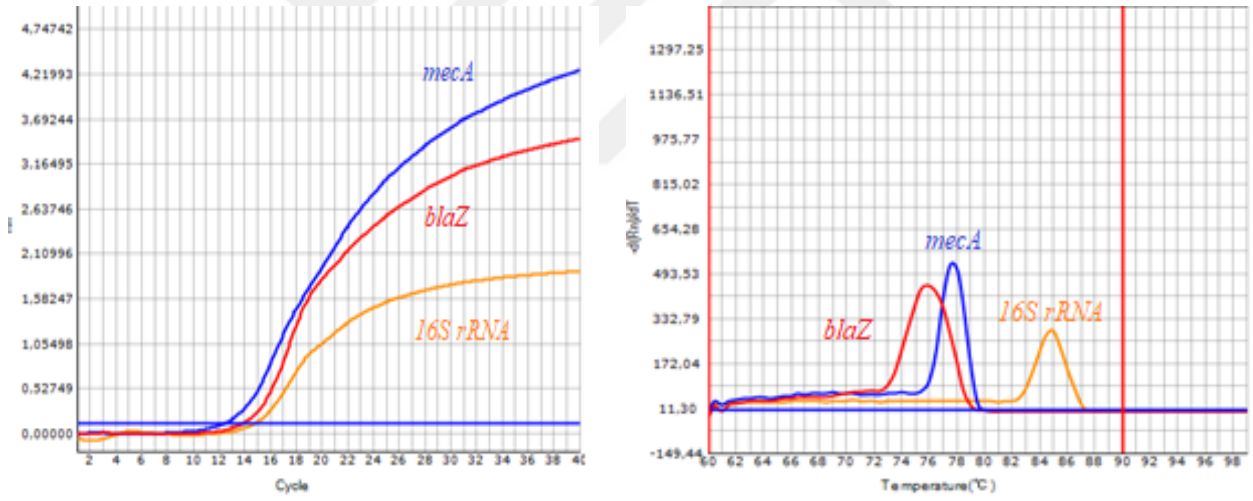
Resim 28. *mecA* Real-Time PCR amplifikasyonu ve "melting curve" grafiği.



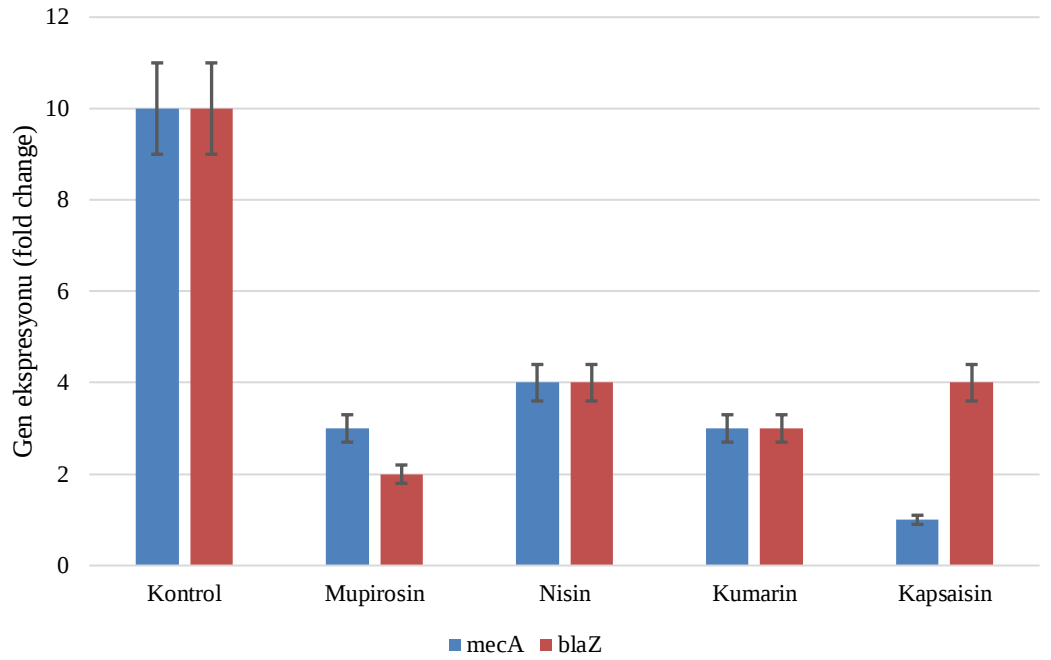
Resim 29. *blaZ* Real-Time PCR amplifikasyonu ve "melting curve" grafiği.



Resim 30. 16S rRNA Real-Time PCR amplifikasyonu ve “melting curve” grafiği.



Resim 31. Pozitif kontrol. Real-Time PCR amplifikasyonu ve “melting curve” grafiği.



Şekil 18. Kapsaisin, Nisin ve Kumarin'in *mecA* ve *blaZ* geni ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkinlikleri.

Deneylerde Kapsaisin, Nisin, Kumarin'in *mecA* ve *blaZ* direnç genleri ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkinlikleri kontrol grubuyla kıyaslamalı olarak verildi. Şekilde de görüldüğü gibi Mupirosin bu iki gen ekspresyonu üzerinde oldukça yüksek etkinlik gösterdi. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin kontrol grubuyla kıyaslandığında bu iki gen ekspresyonunda ciddi azalma meydana getirdi. *mecA* gen ekspresyonu üzerinde Mupirosin'in etkinliğinden Kapsaisin'in etkinliği oldukça yüksek, Nisin'in etkinliği ise düşük bulunurken, Kumarin'in *mecA* geni üzerindeki etkinliği Mupirosin ile kıyaslandığında fark tespit edilmemiştir. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in *blaZ* gen ekspresyonu seviyeleri üzerindeki etkinlikleri Mupirosin ile kıyaslandığında ise her üç kimyasal bileşiğin de bu genin ekspresyonunu inhibe ettiği ancak Mupirosin'in etkinliği kadar güçlü olmadığı tespit edildi (Şekil 18).

4.7. Dokuların Histopatolojik Değerlendirilmesi

Histopatolojik incelemeler sonucu yapılan değerlendirmelerde Nisin tedavi grubunda polimorf çekirdekli hücre infiltrasyonunun olmadığı, ödem ve yangı bulgularına rastlanmadığı tespit edilmiştir. Bu tedavi grubunda damarlanma ve

kollajen birikiminin oldukça yüksek olduğu, histopatolojik olarak iyileşmenin oldukça güçlü olduğu tespit edildi. Nisin tedavi grubunda olduğu gibi Kumarin artı Mupirosin ve Kapsaisin artı Mupirosin kombine tedavi gruplarında histopatolojik değerlendirmeler sonucunda yara iyileşmesinin oldukça başarılı olduğu tespit edilmiştir. Bu tedavi gruplarındaki hayvanların yaralarında ödem ve yangı bulgularına rastlanmazken, damarlaşma ve kollajen birikimi de oldukça belirgin olarak tespit edildi. Bu üç tedavi grubunda yer alan sıçanların yara dokuları tedavi sonunda sağlıklı hayvan dokusu gibi histopatolojik görünümüne sahip olup tedavi başarısı oldukça yüksek olarak bulundu (Resim 32-34).

Kapsaisin tedavi grubundaki hayvan dokularından hazırlanan preperatların histopatolojik değerlendirmeleri sonucunda yara dokusunda kollajen birikimi varlığı tespit edilirken dokuda ödem ve yangı hücrelerinin olması, damarlaşma ve kollajen birikiminin de düşük olarak tespit edilmesi yalnızca Kapsaisin tedavisi verilen grupta tedavi başarısı Nisin grubundaki kadar etkili olmadığı tespit edildi (Resim 35).

Kumarin tedavi grubunda ise yara dokusunda damarlaşma, kollajen birikimi, düşük düzeyde tespit edilirken, ödem ve yangıya yol açan monosit hücre infiltrasyonunun olduğu, bununla birlikte bu dokularda yüksek düzeyde re-epitelizasyonun saptanması tedavi başarısı şeklinde yorumlanabilir (Resim 36,37).

Nisin artı Mupirosin tedavi grubundan hazırlanan preperatların histopatolojik değerlendirmesinde ödem, mononükleer hücre infiltrasyonu ve kollajen birikimi gözlenmiştir (Resim 38).

Kapsaisin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubundan hazırlanan preperatların histopatolojik değerlendirmelerinde reepitelizasyon ve kollajen birikimi oldukça yüksek olarak bulunurken, mononükleer hücre infiltrasyonunun varlığı da tespit edilmiştir (Resim 39).

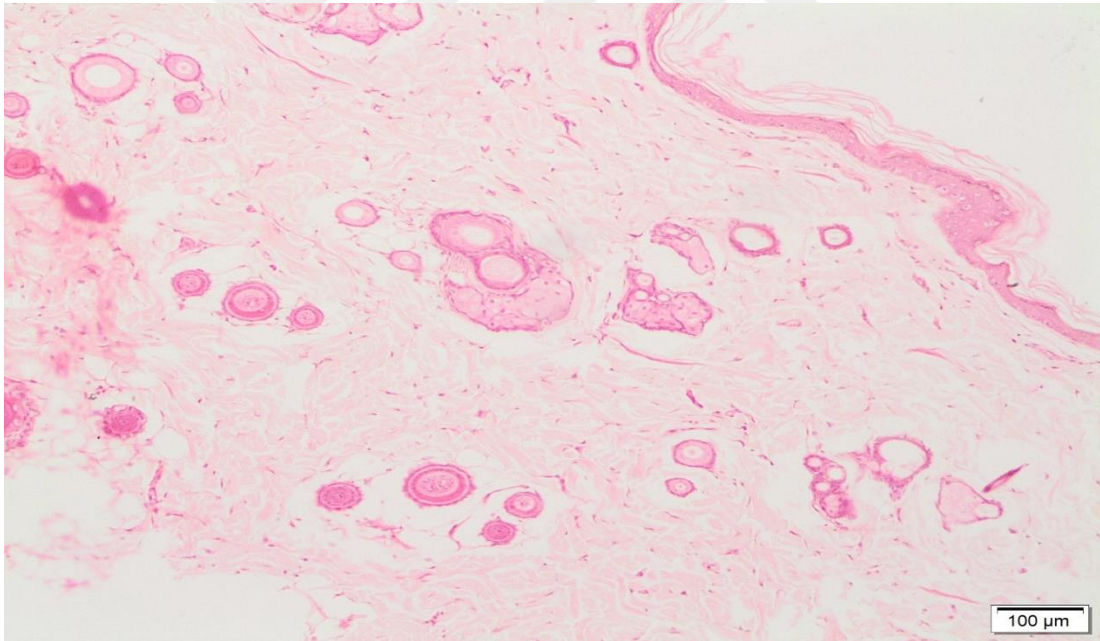
Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubunda damar oluşumu (damarlanma) ve yüksek kollajen birikimi varlığı yanında düşük düzeyde ödem ve yangı bulguları tespit edilmiştir. Bu tedavi grubunda reepitelizasyon bulgularına rastlanılmamıştır (Resim 40).

Kapsaisin artı Kumarin artı Mupirosin tedavi grubunda reepitelizasyonun oldukça belirgin, kollajen liflerinin de saptanmasına rağmen, mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem ve yangı tespit edilmiştir (Resim 41,42).

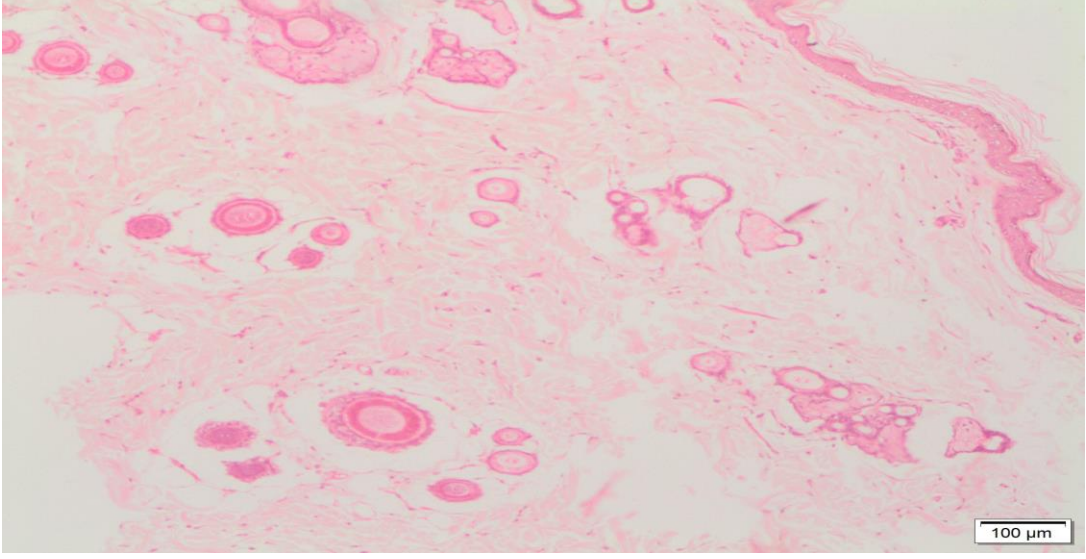
Mupirosin artı Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin dörtlü kombinasyon ile tedavi edilen fare dokularının histopatolojik değerlendirilmesinde yüksek epitelizasyon varlığı, kollajen birikimi tespit edilirken mononükleer hücre infiltrasyonun da varlığının devam ettiği saptanmıştır (Resim 43).

Standart ilaç tedavi grubunda ise Mupirosin ile tedavi sonrası hayvanların dokularının histopatolojik değerlendirmeleri sonucunda kanama ve mononkler hücre infiltrasyonu varlığı tespit edilirken, damar oluşumunun varlığı da gözlenmiştir (Resim 44,45). Mupirosin tedavi grubunda histopatolojik olarak iyileşme bulgularının diğer tedavi grupları ile kıyaslandığında yara iyileşmesinin daha başarılı olmadığı tespit edilmiştir.

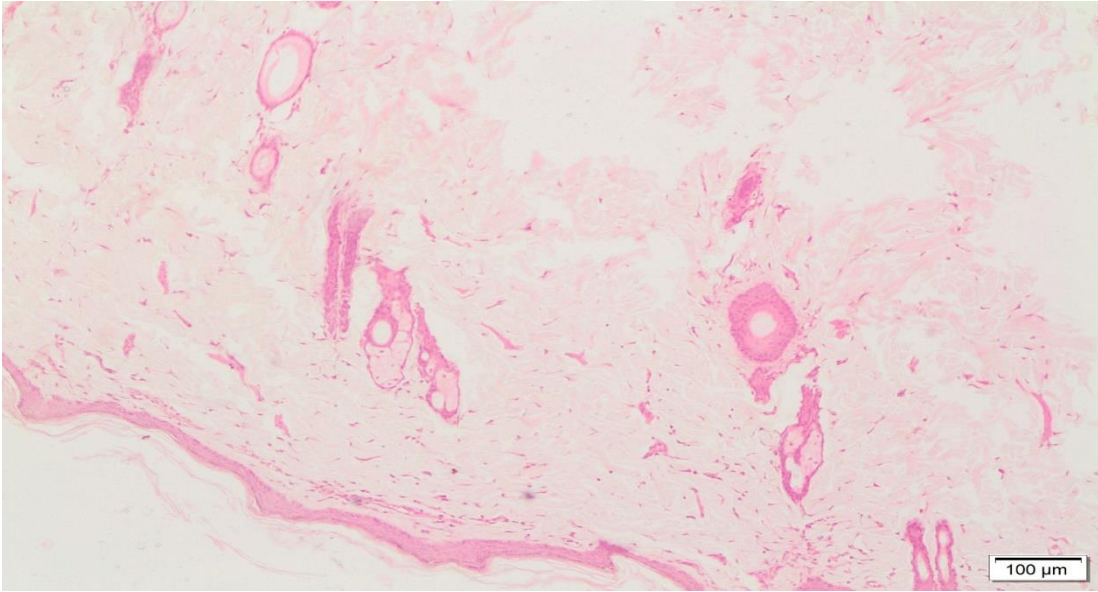
Kontrol grubundaki farelerin dokularında ise yüksek düzeyde mononkler hücre infiltrasyonu, kanama ve ödem varlığı tespit edilirken kollojen liflerinin varlığı da tespit edilmemiştir (Resim 46,47).



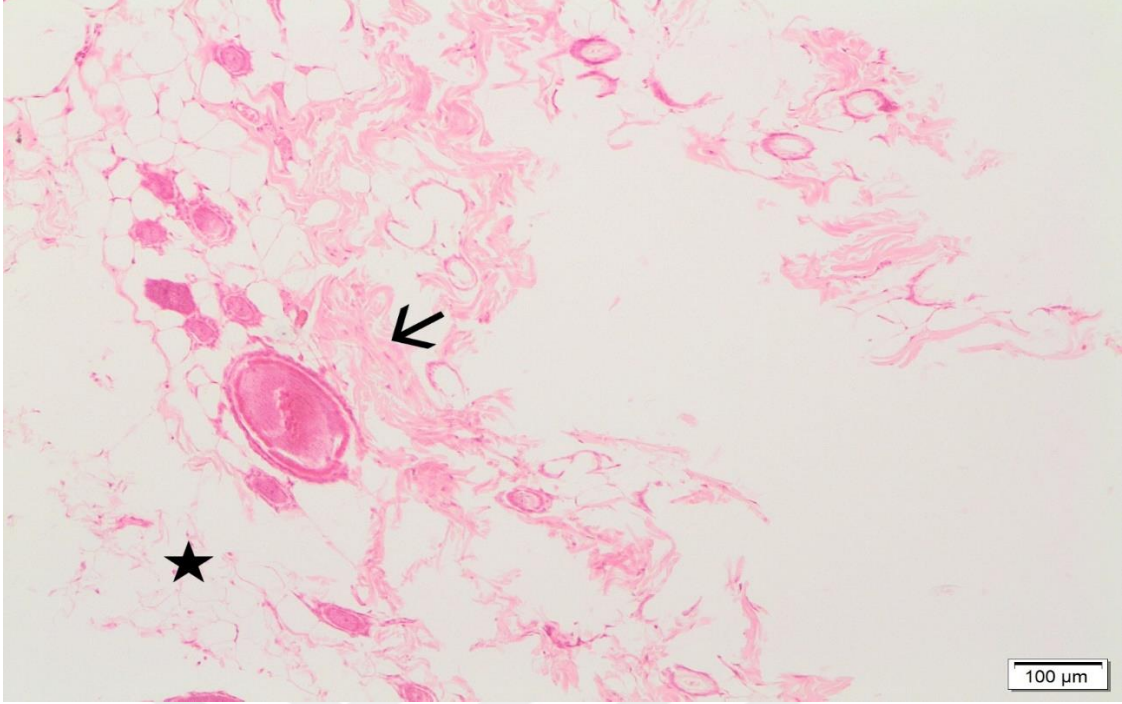
Resim 32. Nisin tedavi grubu. Normal histolojik yapıda deri dokusu, 10×, H&E.



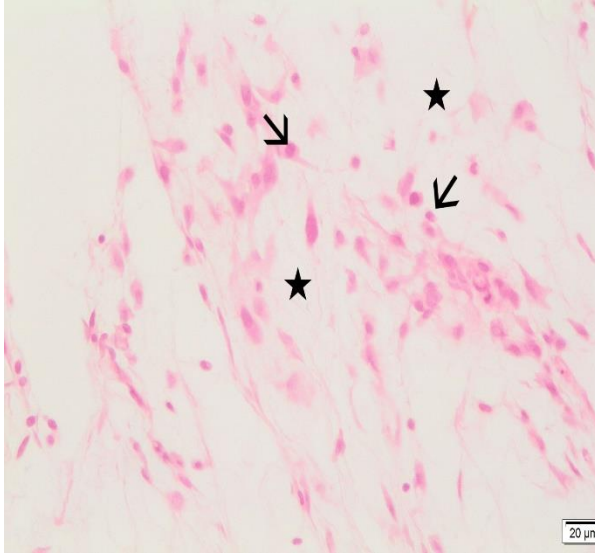
Resim 33. Kumarin artı Mupirosin tedavi grubu. Normal histolojik yapıda deri dokusu, 10×, H&E.



Resim 34. Kapsaisin artı Mupirosin tedavi grubu. Normal histolojik yapıda deri dokusu, 10×, H&E.



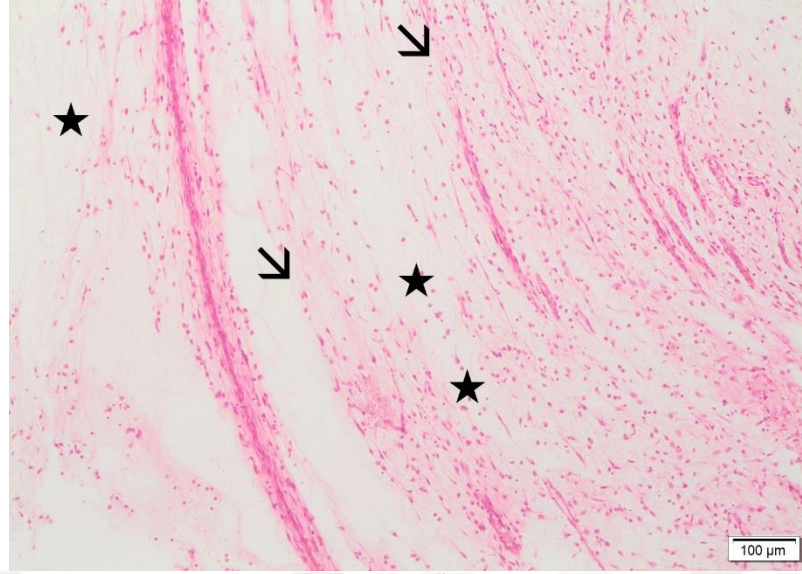
Resim 35. Kapsaisin tedavi grubu. Kollajen birikimi (ok), ödem(yıldız), 10×, H&E.



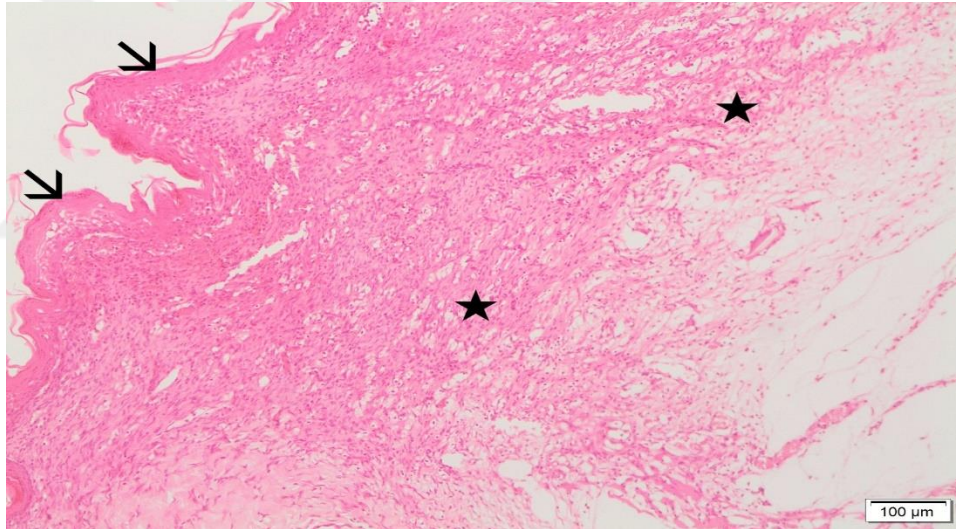
Resim 36. Kumarin tedavi grubu. Ödem (yıldızlar), mononükleer hücre infiltrasyonu(oklar), 40×, H&E.



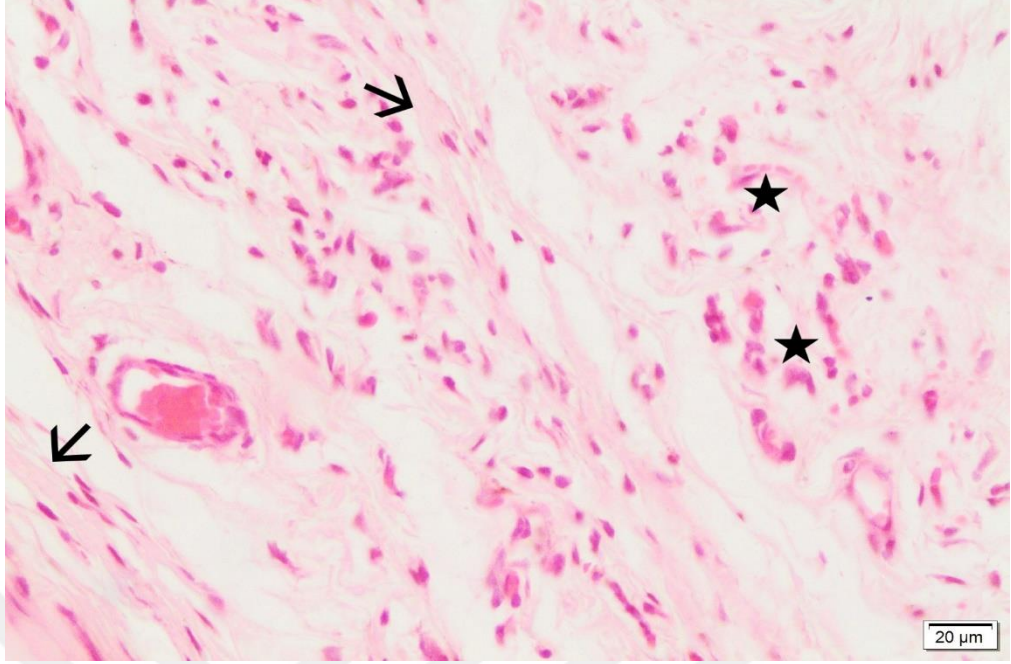
Resim 37. Kumarin tedavi grubu. Reepitelizasyon(ok), 4×, H&E.



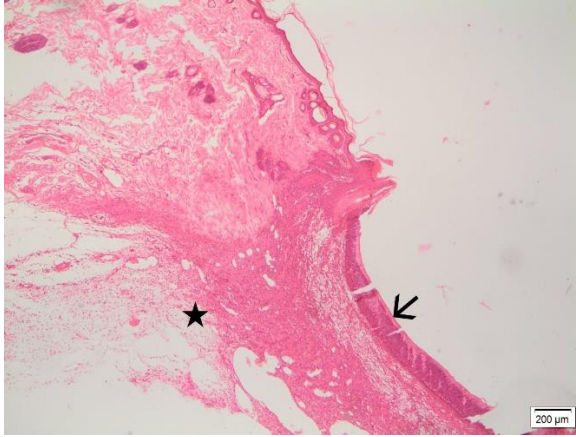
Resim 38. Nisin artı Mupirosin tedavi grubu. Ödem ve mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldızlar), kollajen birikimi (oklar), 10×, H&E.



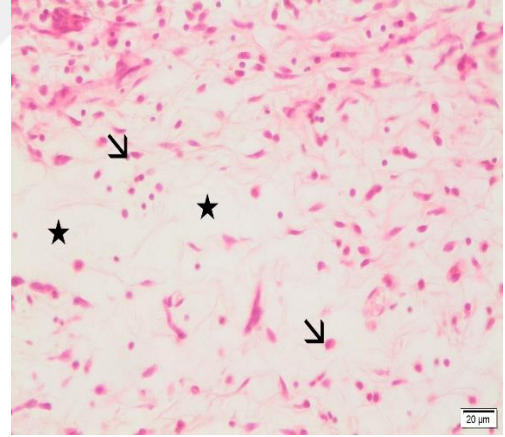
Resim 39. Kapsaicin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubu. Reepitelizasyon(oklar), kollajen birikimi, mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldızlar), 10×, H&E.



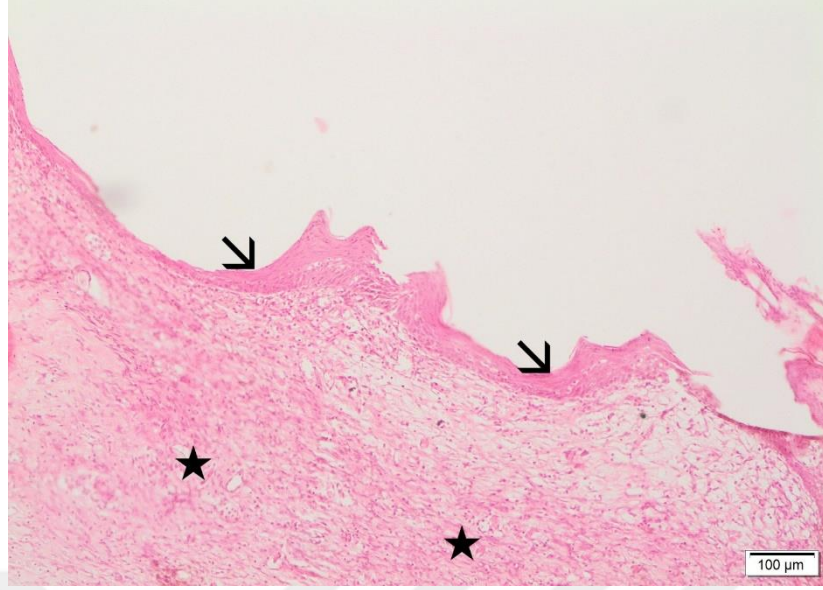
Resim 40. Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubu. Damarlaşma (yıldızlar) kolajen birikimi (oklar), 40×, H&E.



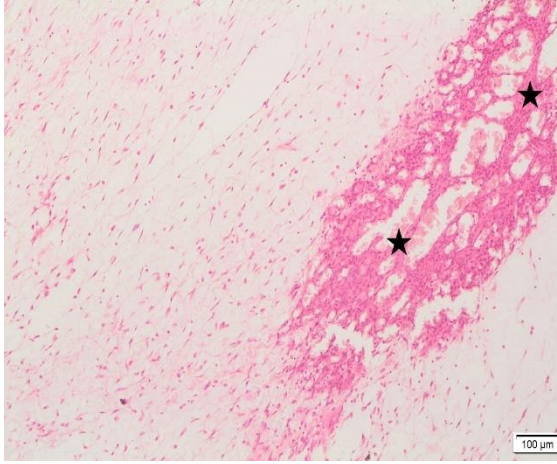
Resim 41. Kapsaisin artı Kumarin artı Mupirosin tedavi grubu. Reepitelizasyon (ok), mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem, yangı (yıldız), 4×, H&E.



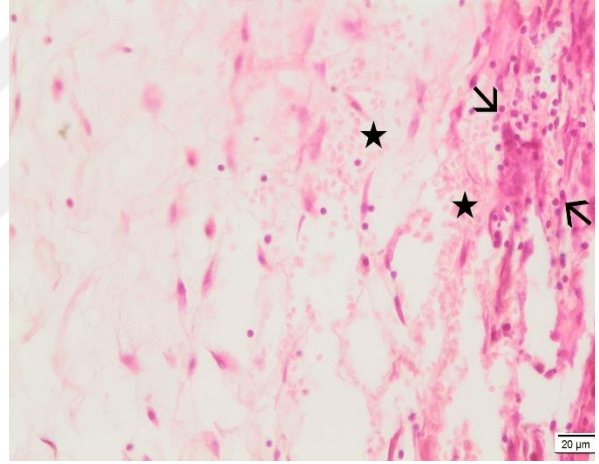
Resim 42. Kapsaisin artı Kumarin artı Mupirosin tedavi grubu. Reepitelizasyon (ok), mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem, yangı (yıldız), 40×, H&E.



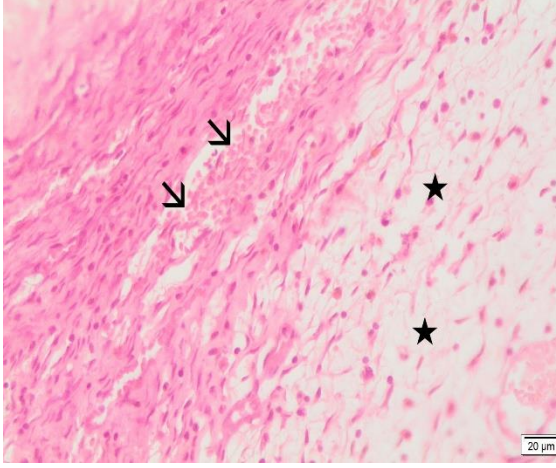
Resim 43. Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubu. Mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldız), reepitelizasyon(ok), 10×, H&E.



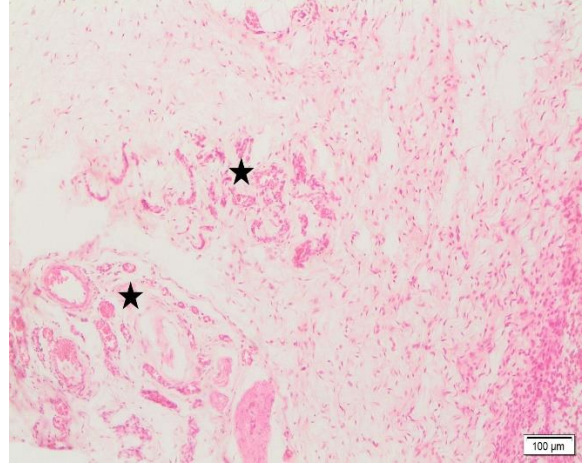
Resim 44. Mupirosin tedavi grubu. Damarlaşma (yıldız), 10x, H&E.



Resim 45. Mupirosin tedavi grubu. Kanama (yıldızlar), mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar), 40x, H&E.



Resim 46. Kontrol grubu. Kanama (oklar), ödem(yıldızlar), 40×, H&E.



Resim 47. Kontrol grubu. Damarlaşma (yıldızlar) 10×, H&E.

5. TARTIŞMA

Staphylococcus aureus enfeksiyonlarına dünyanın tüm ülkelerinde sık rastlanılan ciddi morbidite ve mortalite etkenlerinden biridir. Bu patojen basit yüzeyel cilt enfeksiyonlarından orta veya şiddetli yara/cilt enfeksiyonlarına, mortal seyirli pnömoni ve sepsise kadar çok çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir. *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisi antibiyotik direnci nedeniyle komplike olup enfeksiyonlara karşı etkin bir aşısı mevcut değildir. *S. aureus*'un ürettiği çok sayıda toksin ve diğer virülans faktörleri sebebiyle konakta ciddi tahribatlara yol açabilirken, ilaç direnci de tedavide zorlukların en önemli sebeplerindendir (194).

Staphylococcus aureus her yıl dünya çapında komplike ya da komplike olmayan milyonlarca cilt enfeksiyonuna, şiddetli ve invaziv enfeksiyonlara yol açan yaygın bakteriyel patojenlerden biridir (195). Pnömoni ve diğer solunum yolu enfeksiyonları, cerrahi alan, protez eklem ve kardiyovasküler enfeksiyonların yanı sıra hastane bakteriyemisinde önde gelen etkenlerden biridir (196). *S. aureus* bakteriyemisinin yılda 20- 50 vaka/100.000 arasında değişen bir insidans oranına sahip olduğu ve bu hastaların %10-30'unun enfeksiyon sebebiyle kaybedildiği bildirilmiştir (197). Amerika'da yapılan bir çalışmada da *S. aureus* bakteriyemisine bağlı yıllık ölüm sayısının 20.000 olduğu bildirilmiştir (198). *S. aureus* bakteriyemisi sebebiyle kaybedilen insan sayısının AIDS, tüberküloz ve viral hepatitlerin toplamından daha yüksek ölüme yol açtığı oldukça çarpıcı olup *S. aureus* enfeksiyonlarının önemini ortaya koymaktadır (197). Fronkül, apseler ve yara enfeksiyonları dahil olmak üzere orta derecede şiddetli cilt enfeksiyonları gibi diğer *S. aureus* enfeksiyonları genellikle yaşamı tehdit etmeyen önemli morbidite sebebi olarak seyredebileceği gibi derin doku enfeksiyonlarına ve bakteriyemiye de evrilmesi bakımında oldukça önemlidir (199). Ayrıca, *S. aureus* atopik dermatit gelişimi ile de ilişkili önemli patojenler arasında yer almaktadır (200).

S. aureus enfeksiyonlarında izolatlarda sıklıkla görülen antibiyotik direnci nedeniyle ciddi sorunlar yaşanmaktadır, bunların arasında klinik olarak en önemli MRSA (metisiline dirençli *S. aureus*)'dır (201). Metisiline duyarlı *S. aureus*'un (MSSA) neden olduğu enfeksiyonlara kıyasla MRSA enfeksiyonlarında mortalite, morbidite ve hastanede kalış süresi artmaktadır (202). Klinik izolatlar arasındaki metisilin direnci oranları, İskandinav ülkelerindeki gibi tek haneli oranlardan, ABD ve Çin'deki gibi %50'nin üzerine kadar, ülkeden ülkeye büyük farklılıklar göstermektedir (203). Hastaneye bağlı MRSA enfeksiyonları ABD, Avrupa, Çin ve diğer birçok ülkede muhtemelen artan hijyen ve sürveyans önlemleri sebebiyle azalış gösterirken (204), Afrika gibi az gelişmiş ülkelerde hala yüksek trendi göstermektedir (205). Ayrıca, Amerika gibi gelişmiş bir ülkede bile MRSA'nın neden olduğu ölüm oranı herhangi bir antibiyotiğe dirençli patojen için en yüksek olmaya devam etmektedir. CDC verilerine göre Amerika'da her yıl yaklaşık 20.000 dolayında MRSA sebepli ölüm bildirilmiştir (198). Bunun yanında metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) suşlarının klinik önemi giderek daha fazla bilinmektedir. MSSA suşlarının mortal enfeksiyonlara neden olan yüksek virülansa sahip mikroorganizmalar olabileceği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (206). MSSA enfeksiyonları MRSA enfeksiyonları kadar yakından izlenmemekte olup son yıllarda MRSA'ya karşı koruyucu tedbirlerin uygulanması MSSA enfeksiyonlarında benzer bir azalmaya neden olmamıştır (207).

S. aureus'ta diğer antibiyotiklere karşı direnç de yaygındır. Örneğin betalaktamaza duyarlı betalaktam antibiyotiklere (penisilin ve türevleri) direnç *S. aureus*'ta hemen hemen dünyanın her yerinde görülmektedir (208). Ayrıca *S. aureus* hemen hemen tüm mevcut antibiyotiklere karşı direnç gösterebilmektedir. Vankomisine direnç son yıllarda rastlanılır olsa da, vankomisin MRSA enfeksiyonları için son çare antibiyotik olmaya devam etmektedir (209). Bununla birlikte, vankomisine orta düzeyde dirençli *S. aureus* kökenlerine de rastlanmaktadır (210).

Spesifik antibiyotik direncine ek olarak stafilokoklarda biyofilm oluşumu ile spesifik olmayan antibiyotik direnci birçok *S. aureus* enfeksiyonunda rol oynamaktadır (194). Bunlara protez eklem ve diğer tüm kalıcı tıbbi cihazla ilişkili enfeksiyonlar, endokardit, osteomyelit, konjonktivit ve diğerleri dahildir. Son olarak mastit sığırlarda süt ve et endüstrileri için büyük bir problem oluşturan *S. aureus* aracılı biyofilm ile ilişkili bir enfeksiyondur (211). *S. aureus* çok sayıda toksin üretimi

gerçekleştirmekte olup birçok bakteriyel patojenden daha virülandır. Bu virülans faktörleri arasında çok sayıda toksinleri, bakteriyi immün sistemden koruyan faktörler ve enfeksiyon sırasında konak hücre kolonizasyonunu sağlayan çok çeşitli protein ve protein dışı faktörlerdir. *S. aureus* 19. yüzyılın sonunda önemli bir patojen olarak ilk kez kabul edildiğinden beri *S. aureus* virulansına büyük bir ilgi olsa da son yıllarda *S.aureus* virülans mekanizmalarına yönelik çalışmalar artarak sürmektedir.

S. aureus enfeksiyonlarının çoğu genellikle asemptomatik kolonizasyondan kaynaklanır veya daha nadiren özellikle hastane ortamında, enfekte olmuş eşyalardan veya diğer bireylerden bulaşmaktadır (212). Çalışmalarda farklı vücut bölgelerinin kolonizasyonu ile invaziv enfeksiyonlar arasındaki ilişki olduğu bildirilmiştir (213). Burun *S. aureus*'un ana kolonizasyon bölgesi olarak kabul edilse de *S. aureus* bağırsağa ek olarak birçok deri bölgesini de kolonize edebilmektedir. Popülasyonun yaklaşık %10-30'unda kalıcı kolonizasyon meydana geldiği bildirilmiştir. Genellikle farklı vücut bölgelerinin birlikte kolonizasyonu görülmektedir. Bunun sebebi olarak dokunma, burun karıştırma gibi davranışlarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (214).

Staphylococcus aureus bakteriyel enfeksiyonların en önemli sebeplerinden biri olup özellikle çoklu ilaca dirençli (MDR) *S. aureus*'un yayılması dünya çapında ciddi bir klinik sorun ve önemli bir tehdit olmuştur (10). Dünya Sağlık Örgütü'nün yeni antibiyotik geliştirme öncelik listesinde olan ilaca dirençli *S aureus*; gram pozitif bakterilerde en üst sırada yer almaktadır (215) Bu nedenle sorunu çözmek ve yeni antistafilokok ajanları geliştirmek için acil ancak karşılanmamış bir ihtiyaç olduğu bildirilmektedir (216).

Bakterilerde antibiyotik direnci küresel bir halk sağlığı problemidir. Pazara sunulan yeni antibiyotik tiplerinin sınırlamaları dikkate alındığında bakteriyel enfeksiyonlarla savaşmanın yeni antibiyotiklerden bağımsız yollarını keşfetmek vazgeçilmez bir gerekliliktir. Doğal bileşiklerin antibakteriyel özelliklerine farmakolojik bilimlerde ilgi giderek artmaktadır (217).

Penisilin gibi güçlü antibiyotiklerin yanı sıra diğer antimikrobiyal maddelerin büyük çoğunluğu canlı organizmalar tarafından üretilen doğal bileşiklerdir (218). Bitkiler patojenlerle veya enfeksiyonlarla mücadele etmek, kendilerini korumak ve otçul avcılara karşı korunmak için birçok kimyasal molekül geliştirmişlerdir (218).

Bakteriler antimikrobiyal ajanlara karşı kendilerini korumak için farklı direnç mekanizmaları geliştirmiş bu durum antibiyotiklere dirençli kökenlerin/varyantların ortaya çıkmasına yol açmıştır (218). Moleküler yıkım veya modifikasyon yoluyla antibiyotikleri inaktive eden enzimlerin üretilmesinin yanında, bakterilerin olağanüstü genom değişkenliği antimikrobiyallere karşı direncin temelini oluşturmaktadır (219). Bu durum direnç gelişiminin iki ana ilkesini oluşturur: Birincisi, antibiyotiğin aktivitesini etkileyen mutasyonun gerçekleşmesiyle; antibiyotik molekülüne afinite azalması, ilaç alımının azalması, ilaç akışı artmasıyla veya farklı metabolik yollar ile gerçekleşebilir (219).

İkinci olarak, plazmitler, bakteriyofajlar, transpozonlar ve “patojenite adaları” gibi büyük genom parçaları da dahil olmak üzere genetik elementlerin transferi yoluyla gerçekleşebilir (219, 220). Bu olay aynı veya farklı bakteriyel türler arasında meydana gelebilir (220). Bu nedenle “ana hücreden yavru hücreye” direnç aktarımı dikey transfer yoluyla, bakteriler arasında transformasyon, transdüksiyon veya konjugasyon aracılığıyla yatay gen transferi ile gerçekleşebilmektedir. Ayrıca, direnç genleri kommensal, fakültatif ve zorunlu patojen bakteriler arasında aktarılabilir (221). İlk antibiyotiğin keşfinden bugüne kadar çok sayıda antibiyotik madde keşfedilmiştir. Ancak insanlığın günümüzde bakteriyel enfeksiyonlarla başarılı bir şekilde savaşmak için hala güçlü antimikrobiyal silahlardan yoksun olduğu söylenebilir (218). Çok ilaca dirençli suşlar genellikle rasyonel olmayan antibiyotik kullanımı sebebiyle artış gösterdiğinden yeni antibiyotiklerden bağımsız yollar bulmak giderek daha zor hale gelmektedir (222). Günümüzde kullanılan antibiyotiklerin çoğu 1980’lerde veya çok daha önceki yıllarda keşfedilmiştir (223). Özellikle immunsuprese konaklarda çoklu ilaç dirençli bakteriler ciddi mortalite sebebi olmalarına rağmen yeni antibiyotik sınıflarının uygulanması, ilaç şirketleri için finansal olarak riskli ve daha az kazançlı bir yatırım haline geldiği için yakın gelecekte yeni antibiyotik sınıflarının uygulanması zor görünmektedir (219).

Dünya Sağlık Örgütü orijinal yeni tip antibiyotiklerin üretilmeleri yerine, mevcut antibiyotik tiplerinin iyileştirilmesine odaklanılarak yeni ilaç geliştirme çalışmalarına yoğunlaşıldığını ve bu konudaki endişelerini bildirmektedir (224). İlaç endüstrisinin izlediği bu yaklaşım, şirketler ve yatırımcılar açısından daha güvenli bir yatırım olsa da çapraz direnç gelişebilmesi kolay olduğundan yeni geliştirilen

antibiyotiğe bakterilerin daha hızlı adaptasyonu kaçınılmaz olacaktır (224). Bu sebeple son yıllarda özellikle bakteriyel enfeksiyonlarla mücadele için yeni ve uygun maliyetli yollar bulmaya büyük önem verilmektedir. Bu yolların başında ise doğal bileşikler tek başına veya halihazırda kurulmuş antibiyotiklerle sinerji içinde antimikrobiyal özellikleri açısından araştırmak gelmektedir (225).

Kapsaisin, Capsicum cinsi bitkilerin meyvelerinde değişen konsantrasyonlarda üretilen bir alkaloiddir. Acı biberler de dahil olmak üzere hemen hemen tüm biberlerin keskinliğinden sorumlu Kapsaisin, laktik asit bakterileri tarafından üretilen doğal bir antimikrobiyal peptit olan Nisin ve sekonder bir bitkisel metabolit olan Kumarin zengin farmakolojik özelliklerinden dolayı üzerinde yoğun çalışmaların yapıldığı kimyasal bileşiklerdir.

Kapsaisin türevlerinin aşırı acı ve yakıcı tadı bitkileri otçulardan korumaktadır. Dünyada gastronomilerde baharat olarak kullanımıyla popülerdir. Bunun yanında, Kapsaisin tıpta topikal ağrı kesici, yağ yakma ve kardiyoprotektif özellikleri sebebiyle faydalanılmaktadır (226). Acı biberlerin esas komponentleri arasında Kapsaisinoid, dihidrokapsaisin ve nordihidrokapsaisin yer almaktadır (227), Kapsaisin biber tiplerine göre değişmekle birlikte meyvenin toplam kütlesinin %1'i düzeyine kadar bulunabilmektedir ve tohum yakınındaki plasentanın epidermis hücrelerinde sentezlenir ve plasenta yüzeyinde "kabarcık" birikmektedir (226). Molekül TRPV1 (geçici reseptör potansiyeli vanilloid iyon kanalı reseptörü 1)'in güçlü bir agonisti gibi davranır ve kendine özgü acı, yakıcı tadı sağlamaktadır.

Çoklu farmakolojik ve fizyolojik özellikleri ağrı kesici, antikanserojen etkisi, faydalı kardiyovasküler ve gastrointestinal etkileri (228) yanı sıra Kapsaisin, antimikrobiyal ve anti-virülans aktivitesi nedeniyle son zamanlarda büyük ilgi görmüştür. *Helicobacter pylori* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya (229) karşı bakterisidal bir etki tarif edilmişken, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* ve *Porphyromonas* karşı anti-virülans aktivitesinin olduğu bildirilmiştir (163).

Kumarinler biyolojik aktiviteleri ikame modellerine göre değişen sekonder bitki metabolitidir. Kumarinlerin antiplatelet agregasyon etkisi sergilediği (230), anti-inflamatuar (231) ve güçlü anti-tümöral etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (232). Kumarinlerin çeşitli patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal, anti-kuorum sensing ve anti-biyofilm özelliklerinin olduğu bildirilmiştir. Bir çalışmada *Salmonella*

typhimurium'un biyofilm oluşumundan sorumlu genleri *csgD*, *csgA* ve *adrA*'nın ekspresyon seviyelerini azalttığı bildirilmiştir. Bunun yanında mikroorganizmanın hareket yeteneğini inhibe ettiği de gösterilmiştir (233). Bu nedenle yeni antibiyotikler acil bir ihtiyaçtır. Kumarin, bitki kaynaklı doğal bir üründür ve benzopiron yapısı, türevlerinin, zayıf bağ etkileşimleri yoluyla organizmalardaki çeşitli enzimler ve reseptörlerle kolayca etkileşime girmesini sağlar (234). Bu nedenle Kumarin türevleri, antiinflamatuvar (235), antikanser (236), anti-Alzheimer (237), antimikobakteriyel (238), antifungal (239), antimalaryal (240), antiviral (241), antikoagülan (242) ve antibakteriyel aktiviteler (243) gibi çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir.

Bir çalışmada Kumarin türevlerinin antibakteriyel aktivitesinin, esas olarak bakterilerdeki DNA giraz B alt birimine bağlanma ve ATPaz aktivitesini bloke ederek DNA'nın supercoiling pozisyonunu inhibe etme yeteneklerinden kaynaklandığını gösterilmiştir (244). Birden fazla etki mekanizmasına sahip tek bir molekül oluşturmak için iki veya daha fazla farmakofor tarafından oluşturulan hibrit moleküller tıbbi kimyada şimdiden sıcak bir konu haline gelmiştir. Birden fazla etki mekanizmasına sahip tek bir molekül oluşturmak için iki veya daha fazla mevcut farmakofor tarafından oluşturulan hibrit moleküller son zamanlarda oldukça üzerinde durulan konular arasındadır.

Hibrit moleküllerin farmakoforları, çeşitli farklı hedefler üzerinde etki gösterebilir veya oluşan yan etkileri dengeleyebilir; bu nedenle hibrit moleküller, biyolojik spektrumunu genişletme, etkinliği iyileştirme, ilaç direncini kırma ve yan etkileri azaltma potansiyeline sahiptir (245). Kumarin'in diğer antibakteriyel farmakoforlarla hibridizasyonu yeni antibiyotikler için umut vericidir. Ayrıca, kumarimisin A1, klorobiyosin ve novobiyosin gibi Kumarin içeren birkaç hibrit, çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için klinikte zaten kullanılmaktadır (246), bu da Kumarin içeren hibritlerin yeni antibiyotiklerin geliştirilmesinde yararlı olabileceğini göstermektedir.

Nisin *Lactococcus lactis* tarafından üretilen, elektrostatik etkileşimlerle bakteri hücre yüzeyine bağlanarak antimikrobiyal aktivite gösteren katyonik ve amfifilik bir bakteriyosindir. Bu bakteriyosin, gıda endüstrisinde güvenli ve doğal bir koruyucu olarak kullanılmıştır (247). Nisin, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* gibi gram pozitif bakterilere ve *Clostridium* spp, *Bacillus* spp. endosporlarına karşı

geniş inhibitör etkisi nedeniyle büyük ilgi görmüştür (247). Nisin, süt ürünleri, işlenmiş peynir ve konserve gıdalar dahil olmak üzere doğal bir gıda koruyucusu olarak çok sayıda uygulamaya sahiptir, bu nedenle birçok ülkede raf ömrü uzatıcı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca antimikrobiyal peptit olan Nisin'in termal stabilite, sindirim proteazlarına duyarlılık, toksisite olmaması ve gıda aromalarında istenmeyen değişikliklere neden olmaması diğer pozitif özellikleridir (248). Bununla birlikte, gıda matriksinin bileşenleri ile istenmeyen etkileşimle ilgili bazı sınırlamalar Nisin ve diğer antimikrobiyal peptitlerin kullanımını kısıtlamaktadır (249).

Antimikrobiyal peptitler de dahil olmak üzere, çeşitli umut verici antibiyofilm ajanları yıllar boyunca incelenmiştir. Nisin, laktik asit bakterileri tarafından üretilen doğal bir antimikrobiyal peptittir ve şimdiye kadar en çok çalışılan bakteriyosinlerden biridir (250). Nisin, biyofilmlere hızla nüfus edebilir ve membran hücrelerinde gözenek oluşturabilir (251). Kateterlerde, yaralarda ve yiyeceklerde bulunan gram pozitif organizmaların tek cins biyofilmlerine karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır (252). Benzer şekilde, Nisin, kök kanal enfeksiyonlarında (253) yer alanlar dahil olmak üzere oral patojenlere (250) karşı umut verici sonuçlar göstermiştir. Aslında, Nisin'in yüksek saflıktaki formunun (>%95 saflık), çok türlü oral biyofilmlere karşı düşük içerikli Nisinden (%2.5 saflık) daha güçlü olduğu bulunmuştur (172). Yüksek saflıkta Nisin, insan hücrelerine düşük seviyelerde sitotoksosite ile antibiyofilm aktivitesi sunduğundan, ağız hastalıklarını önlemek veya tedavi etmek için potansiyel bir terapötik ajan olarak kabul edilmiştir (172). Endodontik biyofilmleri yok etmek için yeni stratejilere ihtiyaç vardır. Bu nedenle, yüksek saflıkta Nisin'in tekli ve D-amino asitler ve klorheksidin ile kombinasyonu halinde "endodontik biyofilmler üzerinde etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada Nisin artı klorhekzidin kombinasyonu ile oldukça etkili sonuçlar alındığı bildirilmiştir (254). Bir çalışmada karvacrol, timol ve Nisin'in *Staphylococcus aureus*'a karşı birleşik etkisini araştırılmış, Karvakrol artı Timol artı Nisin kombinasyonlarının mikroorganizmanın MİK değerinde anlamlı azalışlar meydana getirdiği saptanmıştır (255).

Çalışmamızda Nisin'in etkinliği Mupirosin'in etkinliğinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş, yara iyileşmesi hazırlanan histopatolojik değerlendirmelerle de belirgin tespit edilmiştir. Ayrıca, Nisin'in Mupirosinle kombine kullanıldığı tedavi gruplarında *in-vitro* testlerde oldukça güçlü sinerjistik aktivite tespit

edilmiş, kombine kullanımda Nisin'in Mupirosin'in etkinliğini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığı saptanmıştır ($p=0.046$). Kapsaisin'in etkinliği kontrol grubuyla kıyaslandığında bakteri sayısında anlamlı derecede azalma tespit edilirken, Kapsaisin artı Mupirosin kombine tedavi grubunda antibakteriyel etkinliğin yalnız Mupirosin'in etkinliğinden daha güçlü olduğu tespit edilmiştir ($p<0.042$). Kumarin'in *S. aureus*'a karşı etkinliğinin de Kapsaisin'in etkinliğine benzer olduğu bulunmuştur. Kumarin kontrol grubuyla kıyaslandığında *S. aureus* sayısında anlamlı azalma meydana getirirken, tekli Kumarin'in etkinliğinin Mupirosin'in etkinliğinden daha güçlü olmadığı ancak, Mupirosin artı Kumarin tedavi grubunda Mupirosin etkinliğinden daha güçlü bir antibakteriyel etkinlik olduğu tespit edilmiştir. Deneylerde Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in non-toksik konsantrasyonlarda *S.aureus*'a karşı belirgin bir aktivite sergilediği, bu bileşiklerin Mupirosinle birlikte kullanıldığında Mupirosin'in etkinliğinden daha güçlü antibakteriyel etkinlik sergilediği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda kimyasal bileşiklerin ikili, üçlü ve dörtlü kombinasyonlarının *S.aureus*'a karşı etkinliklerinin araştırıldığı deneylerde Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in Mupirosin ile ayrı kombinasyonlarında tekli Mupirosin'in etkinliğinden anlamlı derecede güçlü sinerjistik aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir ($p<0.05$)

Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in Mupirosin ile kombine olarak kullanıldığı tedavi grubunun bakteri üremesini en yüksek düzeyde inhibe eden grup olduğu saptanmıştır. Bu dörtlü kombinasyonun *S. aureus* üzerinde diğer kombinasyonlardan daha etkili olduğu saptanmıştır. İkili, üçlü ve dörtlü kombinasyonlarda etkinliğin artmasını doğal bileşiklerin ve Mupirosin'in bakteri hücresi tarafından daha kolay hücre içine alınmasını tetiklediğini düşünmekteyiz.

S. aureus'un konak hücrede enfeksiyon oluşturmaya ve/veya konak immunitesinden korunmasında en önemli mekanizmalardan birisi mikroorganizmanın biyofilm oluşturmaya (219). Stafilokoklar kalıcı tıbbi cihazların abiyotik materyali üzerinde vücuttaki yabancı cisimlerde biyofilm tabakası oluşturmaya ile karakteristiktir. Biyofilm oluşumu üç ana aşamada gelişir: Adezyon, olgunlaşma/çoğalma ve ayrılma. Adezyon yüzey proteinleri yoluyla insan matriks proteinlerine gerçekleşir (256). İkinci aşamada, hücreleri birbirine bağlayan ve *S.aureus*'ta PIA/PNAG ekzopolisakkarit (88), ekstrasellüler DNA (257), teikoik asitler

(258) ve genellikle amiloid oluşturan- SasG gibi proteinlerden oluşan bir biyofilm matriksi üretilir (259). Biyofilmler, PSM'lerin sürfaktan aktivitesi ve proteazlar gibi parçalayıcı ekzoenzimler tarafından oluşturulan kanallarla ayrı bir üç boyutlu yapıya sahiptir (260). Hücre kümelerinin biyofilmden ayrılması, bu biyofilm yapılandırıcı faktörlerin yoğun aktivitesi ile gerçekleşir. Enfeksiyon sırasında biyofilm oluşumunun ana rolü bakterileri fagosit saldırılarından korumaktır (261).

Dolayısıyla *S. aureus*'un en önemli virülans faktörlerinden biri olan biyofilm üretme potansiyelidir. Deneylerde Nisin artı Kumarin artı Mupirosin kombine tedavi grubunda biyofilm üretimi en düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Slime(Biyofilm) üretme potansiyeli üzerindeki en güçlü inhibitör etkinlik bu kombinasyonda tespit edilirken, slime üretiminin hem kontrol grubundan hem de Mupirosin tedavi grubundan anlamlı derecede düşük bulundu. Kapsaisin'in *S. aureus*'un slime oluşturma kapasitesi üzerindeki çalışmalarda tek başına Kapsaisin'in slime üretimi üzerinde anlamlı bir azalmaya yol açmazken, özellikle dördü kombinasyon tedavi grubu (Kapsaisin artı Nisin artı Kumarin artı Mupirosin)'nda bakterinin slime üretimi kapasitesini yaklaşık %80 nispetinde azalttığı tespit edilmiştir ($P<0.01$, Şekil 13).

Bakterilerin hücre yüzeyine adezyonu konak hücre kolonizasyonu için son derece önemlidir. Bakterilerin konak hücreye tutunmasının inhibisyonu önemli bir basamak olarak değerlendirilmektedir. Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in Vero hücrelerine adezyonunun araştırıldığı deneylerde Kumarin ve Kapsaisin'in hücre adezyonu üzerindeki etkinliği Mupirosin'in etkinliğinden düşük olsa da anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($P>0.05$). Fakat Nisin'in etkinliğinin Mupirosin'in etkinliğinden anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu saptanmıştır ($P=0.037$).

Kimyasal bileşiklerin hücre adezyonu üzerindeki etkinlikleri Kumarin artı Mupirosin, Kapsaisin artı Mupirosin ve Kapsaisin artı Kumarin artı Mupirosin gruplarında kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulunurken, Mupirosin etkinliği ile kıyaslandığında anlamlı fark bulunamamıştır. Bunlar dışında dördü kombinasyonun etkinliği, Kumarin artı Nisin artı Mupirosin'in etkinliği, Kapsaisin artı Nisin artı Mupirosin ve Nisin artı Mupirosin'in etkinlikleri Mupirosin'in tekli etkinliği ile kıyaslandığında Mupirosin'inkinden anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Deneylerde *S. aureus*'un konak hücre adezyonu üzerindeki etkinliğinin Nisinden kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Çalışmamızda Nisin bakteriyel adezyonun

inhibisyonunda güçlü bir etkinlik sergilemiştir. Bunun yanında Kapsaisin ve Kumarin'in Mupirosin ile kombinasyonları hücre adezyonunda etkin bulunmazken bu kombinasyonlara Nisin'in eklenmesi durumunda inhibisyonun arttığı tespit edilmiştir.

Kapsaisin'in *S. aureus*'un Vero hücrelerine adezyonu üzerinde etkinliğini araştırdığımız kombine tedavi gruplarında Kapsaisin artı Mupirosin tedavi grubunda Mupirosin'in etkinliği ile kıyaslandığında anlamlı bir etkinlik tespit edilmese de, Kapsaisin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubu bakterilerin hücre adezyonunda anlamlı derecede inhibisyon tespit edilmiştir. Benzer şekilde Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin kombine tedavi grubu hücre adezyonunun en etkili şekilde inhibe edildiği grup olarak tespit edilmiştir. Bu da güçlü bir sinerjistik etkinliğin varlığı olarak değerlendirilmiştir.

Mikroorganizmanın konak hücreye adezyon yapması/tutunması doku hasarı için yeterli olmamaktadır. Konak hücreye adezyon yapan mikroorganizmanın konakta enfeksiyon oluşturabilmesi için hücre, doku ve organlara invaziv etki (yayılım) göstermesi gerekmektedir. Patojenin invazyonun engellenmesi de enfeksiyonun önlenmesi için bir diğer kritik basamaktır. Deneylerde Nisin'in hücre invazyonu Mupirosin ile kıyaslandığında Nisin'in anti-invazif etkinliğinin Mupirosinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$), Kumarin'in etkinliği Mupirosin'in etkinliğinden güçlü olsa da bu iki grup arasında anlamlı derecede fark bulunmamıştır. Kapsaisin'in etkinliği ise Mupirosin'in etkinliğinden ve kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşük olarak saptanmıştır. Kapsaisin'in *S. aureus*'un konak hücre invazyonu üzerinde etkinliğinin olmadığı tespit edilmiştir.

Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in *S. aureus*'un hücre invazyonu üzerindeki etkinliklerinin araştırıldığı deneylerde Mupirosin ile ikili ve üçlü kombinasyonların tümünde istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek etkinlik tespit edilmiştir ($P<0.05$). Hücre invazyonunun inhibisyonunda en dikkat çekici etkinlik dördü kombinasyonla elde edilmiştir. Bunu sırasıyla, Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubu, Kapsaisin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubu ve Nisin artı Mupirosin tedavi gruplarının takip ettiği tespit edilmiştir ki, bununla mikroorganizmanın hücre invazyonu üzerinde en etkili bileşiğin Nisin olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 16,17).

Kapsaisin'in bakterinin hücre invazyonuna karşı en güçlü tedavi grubunun hücre adezyonunda olduğu gibi dörtlü kombinasyon (Kapsaisin artı Nisin artı Kumarin artı Mupirosin kombinasyonu) olduğu tespit edilmiştir (P=0.037). Bununla birlikte Kapsaisin artı Nisin artı Mupirosin kombine tedavi grubunda da benzer şekilde bakterinin invazyon yeteneğinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (P=0.020).

Betalaktam antibiyotikler stafilokok enfeksiyonları için birinci basamak tedavide verilmesi gereken ilaçlardır. Vankomisin, kinupristin-dalfopristin, tigesiklin, daptomisin ve linezolid gibi alternatif tedavi seçenekleri bulunmaktadır. Ancak, vankomisinin doku penetrasyonunun az olması, kinupristin-dalfopristin, tigesiklin, daptomisin ve linezolid'in yüksek maliyetli, rifampinin ise toksisitesinin yüksek olması gibi sebeplerden kullanımları sınırlı olup, özellikle bu noktada yeni tedavi seçeneklerine, yeni moleküllere veya yüksek etkinlikli, düşük toksisiteli kombine tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır (262).

Bakteri enfeksiyonlarına karşı antimikrobiyellerin kullanımı en potent silahlardan biri olsa artan ilaç direnci sebebiyle patojenlerle mücadele daha zor bir hal almıştır. *S. aureus*'da ilaç direncinden sorumlu önemli iki gen metisilin ve penisilin direncinden sorumlu olan *mecA* ve *blaZ* genleridir. Tedavide bu genlerin eksprese edilmeleri ilaç direncinin en önemli mekanizmaları arasında yer almaktadır. Bu ilaç direnç genlerinin susturulması tedavide son derece önemlidir. Çalışmamızda kontrol grubuyla kıyaslandığında Mupirosin tedavi grubunda hem *mecA* hem de *blaZ* genlerinin ekspresyon düzeylerinin anlamlı düzeyde inhibe edildiği tespit edilmiştir. Nisin, Kumarin ve Kapsaisin'in bu iki gen ekspresyonu üzerindeki etkinlikleri kontrol grubundan anlamlı derecede düşük olarak tespit edilmiştir. *blaZ* gen ekspresyonu seviyeleri üzerindeki etkinlikleri Mupirosin ile kıyaslandığında her üç kimyasal bileşiğin de bu genin ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde inhibe ettiği ancak Mupirosin'in etkinliği kadar güçlü olmadığı tespit edilmiştir.

mecA gen ekspresyonu üzerinde Mupirosin'in etkinliğinden Kapsaisin'in etkinliği anlamlı derecede yüksek, Nisin'in etkinliği ise düşük olduğu bulunmuştur. Kumarin'in *mecA* geni üzerindeki etkinliği Mupirosin ile kıyaslandığında ise anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. *mecA* ve *blaZ* genlerinin ekspresyonları üzerinde etkinliklerinin değerlendirildiği testlerde antibiyotik direnciyle mücadele de oldukça önemli sonuçlar elde edilmiştir.

Antibiyotik direnci küresel bir sorun haline gelmiştir. *S. aureus* antimikrobiyallerin uyguladığı seçici baskı nedeniyle daha hızlı ilaçlara direnç geliştirme yeteneğine sahip bir mikroorganizmadır (263). Direnç kromozom veya plazmid aracılı olup transdüksiyon, transformasyon ve konjugasyonla olabilmektedir (264). *S. aureus* kökenlerindeki *blaZ* geni B-laktam grubu antibiyotiklere yani penisilin ve türevlerine karşı dirence aracılık etmektedir (265). *mecA* geni PBP'lerde değişikliklere yol açarak metisilin ve diğer betalaktam grubu antibiyotiklere dirençten sorumludur. Bunun yanında bazı Borderline Oksasilin dirençli *S. aureus* (BORSA) suşları ise hiper betalaktamaz üreticileri olup bakterinin *mecA* geni varlığına bakılmaksızın oksasilin direnci göstermesine sebep olmaktadır (264). Aminoglikozid direnci ribozomal genlerdeki mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkabilmekte ve ribozomal proteinlerde antibiyotiğin bağlanma kapasitesini ve etkisini engelleyebilecek yapısal değişikliklere neden olabilmektedir. *aacA-APHD* geni tarafından kodlanan iki işlevli bir protein tarafından katalize edilen aminoglikozid asetiltransferazlar (AAC) veya aminoglikozid fosfotransferazlar (APH) gibi hücresel enzimlere bağlı olarak antibiyotik alımının azalması veya antibiyotik katyonunun değiştirilmesi de aminoglikozid direncinden sorumlu olabilmektedir (266). Tetrasiklin direnci, plazmit üzerinde bulunan *tetK* ve *tetL* genlerinden kaynaklanmaktadır. Bu genler aktif akışı kontrol eder. Ribozomal korumaya, transpozon veya kromozom üzerinde bulunan *tetO* veya *tetM* genleri aracılık eder. Orta düzeyde Vankomisin direnci, *vraSR* operon ve *graS* geninden kaynaklanmaktadır. Enterococci *vanA* geninin kazanılması VRSA gelişimine neden olabilir. Vankomisine maruz kalındığında değişen peptidoglikan sentezi, hücre duvarının kalınlığında bir artışa yol açarak ilacın bakteri hücresine difüzyonunu bozabilir. Makrolid antibiyotiğe karşı indüklenebilir direnç genellikle plazmit üzerinde bulunan *ermC* geninden kaynaklanır. *ermA* geninin aracılık ettiği direnç, kromozomal mutasyonlardan kaynaklanabilir. Esas dirence, plazmit üzerindeki *ermB* geni aracılık eder. Daha az yaygın olarak *msrA*, *msrB*, *mphC*, *lnuA* genleri bu antibiyotik direnci ile ilişkilidir.

S. aureus'a karşı in-vitro etkinliklerini konak hücre adezyonu, invazyonu, direnç genleri ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi yöntemleriyle araştırdığımız çalışmada *S. aureus* ile oluşturulan yara modelinde in-vitro tedavi gruplarının deneysel yara modelinde etkinlikleri araştırılmıştır. Yara iyileşmesi çoklu hücrelerin,

sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin görev yaptığı komplike bir süreçtir. Yara iyileşmesinde doku kaybının ve hasarının minimize edilmesi, dokunun kanlanması ve oksijenizasyonu, hücrelere beslenmesi mutlak önemli olup yara gerilim kuvvetinin normale dönmesi büyük öneme sahiptir. Yaranın iyileşmesi yeniden şekillenme yani “remodelling” safhasında kollajen salınımı büyük öneme sahiptir. Yaranın gerilme kuvveti kollajen liflerinin varlığı ya da kalınlığı ile direkt ilişkilidir. Dolayısıyla kollajen salınımı yara iyileşmesinde önemlidir, varlığı önemli iyileşme göstergesi veya kriteridir. Yüksek kollajen liflerinin varlığı yırtılmalara karşı direncin arttığı anlamına gelmektedir.

Çalışmamızda Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubunda en hızlı yara iyileşmesi tespit edilmiştir. Bu gruptaki yara iyileşmesi standart ilaç tedavi grubu olan Mupirosin tedavi grubundan daha güçlü olarak tespit edilmiştir. Bu gruptaki farelerden alınan doku örneklerinin histo-patolojik incelemelerinde dokuda ödem ve yangı hücrelerine, damarlaşmaya rastlanılmazken yoğun kollajen birikimi ve epitelyal rejenerasyon varlığı tespit edilmiştir. Bunun yanında, Kapsaisin artı Kumarin artı Mupirosin tedavi grubunda da benzer olarak ödem ve yangı, damarlaşma, kollajen birikimi varlığı tespit edilirken, epitelyal rejenerasyon hızının da oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir.

İn-vitro deneylerde Kapsaisin’in tekli *S. aureus*’a karşı etkinliği yüksek bulunmamışken, Kapsaisin artı Mupirosin tedavi grubunda yara iyileşmesinin Mupirosin tedavi grubundan anlamlı derecede yüksek bulunması güçlü bir sinerjizm varlığı olarak değerlendirilmelidir. Benzer şekilde in-vivo güçlü sinerjistik ilişki varlığı Nisin artı Mupirosin tedavi grubunda ve Kumarin artı Mupirosin tedavi grubunda da tespit edilmiştir. Kimyasal bileşiklerden tekli Nisin tedavi grubunda invivo etkinliğin yüksek olduğu da tespit edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada öncelikle Nisin, Kumarin ve Kapsaisin'in Vero hücreleri (Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücre hattı) üzerinde non-sitotoksik konsantrasyonları tespit edilmiş, non-sitotoksik konsantrasyonlar dahilinde bu biyolojik komponentlerin MRSA üzerindeki in-vitro ve in-vivo etkinlikleri araştırılmıştır.

Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in MRSA'ya karşı oldukça güçlü antibakteriyel etkinlik sergiledikleri tespit edilmiştir. Özellikle Nisin'in etkinliğinin MRSA'ya karşı standart ilaç olarak kullanılan Mupirosin'in etkinliğinden daha güçlü etkinlik sergilediği tespit edilmiştir. Bu üç komponentin antibakteriyel etkinliği yüksekten düşüğe sırasıyla Nisin, Kumarin ve Kapsaisin olarak saptanmıştır.

Çalışmada Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in ilaç direnç genleri *blaZ* ve *mecA* genlerinin ekspresyonları üzerindeki etkinlikleri Real-Time PCR yöntemiyle araştırılmış, bileşiklerin etkinliği kontrol grubuyla kıyaslandığında bu genlerin ekspresyonlarını anlamlı derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Bileşiklerin tekli kullanımından ziyade Mupirosin ile kombine kullanımı durumunda Nisin artı Mupirosin tedavi grubunda olduğu gibi Kapsaisin artı Mupirosin, Kumarin artı Mupirosin tedavi gruplarında da tekli Mupirosin'in anti-MRSA etkinliğinden anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P=0.034$).

Bileşiklerin Mupirosin ile kullanıldığı üçlü ya da dörtlü kombinasyonlarda antibakteriyel etkinliğin anlamlı derecede arttığı tespit edilirken, en güçlü etkinliğin Nisin artı Kapsaisin artı Kumarin artı Mupirosin kombinasyonu ile elde edildiği saptanmıştır ($P=0.049$).

S. aureus'un önemli patojenite faktörlerinden olan slime üretimi üzerindeki etkinlik testlerinden bu üç bileşiğin slime üretimi üzerindeki etkinlikleri fenotipik olarak araştırılmış, tekli Nisin, Kapsaisin, Kumarin ve Mupirosin'in slime üretimi üzerinde etkisiz olduğu tespit edilirken, kombinasyon tedavi gruplarında özellikle Kumarin artı Nisin artı Mupirosin kombine tedavi grubunda bakterinin slime üretiminin anlamlı derecede inhibe edildiği saptanmıştır ($P<0.01$). Benzer şekilde

Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mmupirosin kombinasyonunda da anlamlı derecede slime üretimi inhibe edilmiştir ($P<0.01$).

Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in *S. aureus*'un hücresel adezyon ve invazyona etkisi Vero hücreleri üzerinde araştırılmıştır. *S. aureus*'un hücre adezyonu üzerinde en güçlü etkinliğin Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi grubunda görüldüğü tespit edilmiştir ($P=0.037$).

S. aureus'un invazyonunda ise en etkili molekülün Nisin olduğu ($P=0.014$), Kapsaisin'in ise hücresel invazyona etkinliği düşük olarak bulunmuş, Kumarin'in etkinliği ile Mupirosin'in etkinliği kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).

Nisin artı Mupirosin, Kapsaisin artı Nisin artı Mupirosin, Kumarin artı Nisin artı Mupirosin ve Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin tedavi gruplarında hücresel invazyonun Mupirosin'in etkinliğinden anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$).

Kombine kullanımları bileşiklerin tekli kullanımlarından daha güçlü veya daha düşük etki gösterebilmektedir. Çalışmamızda gerek kimyasalların birbirleriyle ve standart ilaçla kombine etkinlikleri gerekse de sadece standart ilaçla kombine etkinliklerinin varlığını araştırdığımız deneylerde farklı sonuçlar alınmıştır.

Çalışmada, Nisin, Kapsaisin ve Kumarin'in birbirleriyle ve Mupirosinle farklı kombinasyonlarının MRSA'ya karşı güçlü etkinlikler ve sinerjiler oluşturduğu tespit edilmiştir. Kapsaisin artı Kumarin artı Nisin artı Mupirosin kombinasyonunun *S.aureus*'un hem ilaç direncinin hem de slime üretimine karşı güçlü bir etkinlik sergilediği, çarpıcı bir aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu kombinasyonun MRSA etkenli yara enfeksiyonları başta olmak üzere diğer hastalıklara karşı oldukça önemli yeni alternatif formülasyon olabileceğini düşünmekteyiz. Bu komponentlerin ve kombinasyonların ilaç direncine bağlı tüm dünyada artan morbidite ve mortaliteye karşı önemli alternatif seçenekler olabileceği kanaatindeyiz.

Antimikrobiyal direnç günümüzde oldukça ciddi bir sorun olup bu sorunu aşabilmek için yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Artan ilaç direnci sebebiyle tüm antibiyotiklerin yetersiz kalabileceği tehlikesi tüm insanlık için ne yazık ki uzak görünmemektedir. Bu sebeple yeni ilaç araştırmaları veya eldeki ilaçların farklı

kimyasal bileşiklerle ve/veya doğal ürünlerle reformüle edilerek etkinliklerinin arttırılmaları, dirençli suşlara karşı etkili hale getirilmeleri son derece büyük öneme sahiptir. Bu problemten hareketle planladığımız bu çalışma sonuçlarımızın desteklenecek ileriki çalışmalarla yeni ilaç formülayonları için oldukça değerli olabileceğini düşünmekteyiz.



7. KAYNAKLAR

1. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et. al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet infectious diseases*. 2005 Dec 1;5(12):751-62.
2. Becker K, Schaumburg F, Fegeler C, Friedrich AW, Köck R. *Staphylococcus aureus* from the German general population is highly diverse. *International Journal of Medical Microbiology*. 2017 Jan 1;307(1):21-7.
3. Lee AS, De Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et. al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews Disease primers*. 2018 May 31;4(1):1-23.
4. Boyle-Vavra S, Daum RS. Molecular strategies of *Staphylococcus aureus* for resisting antibiotics. *Staphylococcus Genet. Physiol*. 2016 Oct 15;249-300.
5. Haaber J, Penadés JR, Ingmer H. Transfer of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*. 2017 Nov 1;25(11):893-905.
6. Kirby WM. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science*. 1944 Jun 2;99(2579):452-3.
7. Bondi Jr A, Dietz CC. Penicillin resistant staphylococci. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1945 Oct;60(1):55-8.
8. Berg T, Firth N, Apisiridej S, Hettiaratchi A, Leelaporn A, Skurray RA. Complete nucleotide sequence of pSK41: evolution of staphylococcal conjugative multiresistance plasmids. *Journal of Bacteriology*. 1998 Sep 1;180(17):4350-9.
9. Tenover FC, McDougal LK, Goering RV, Killgore G, Projan SJ, Patel JB, et. al. Characterization of a Strain of Community-AssociatedMethicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* WidelyDisseminated in the UnitedStates. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Jan;44(1):108-18.
10. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*. 2009 Sep;7(9):629-41.
11. Novick RP, Roth C. Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 1968 Apr;95(4):1335-42.
12. Vestergaard M, Frees D, Ingmer H. Antibiotic resistance and the MRSA problem. *Microbiology spectrum*. 2019 Mar 22;7(2):2-7.

13. Reen FJ, Gutiérrez-Barranquero JA, Parages ML. Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018 Mar;102(5):2063-73.
14. Özel B, Şimşek Ö, Akçelik M, Saris PE. Innovative approaches to nisin production. *Applied microbiology and biotechnology*. 2018 Aug;102(15):6299-307.
15. Field D, Begley M, O'Connor PM, Daly KM, Hugenholtz F, Cotter PD, et. al. Bioengineered nisin A derivatives with enhanced activity against both Gram positive and Gram negative pathogens.
16. Field D, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bioengineering of the model lantibiotic nisin. *Bioengineered*. 2015 Jul 4;6(4):187-92.
17. Shin JM, Gwak JW, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. Biomedical applications of nisin. *Journal of applied microbiology*. 2016 Jun;120(6):1449-65.
18. Borges MF, Roleira FM, Milhazes NJ, Villare EU, Penin LS. Simple coumarins: Privileged scaffolds in medicinal chemistry. *Frontiers in Medicinal Chemistry*. 2010 Dec 10;4:23-85.
19. Qian L, Han X, Han H, Chen X, Yuan H. Research progress on coumarin and its derivatives. *Guangzhou Huagong* 2013;41(1):41-3.
20. Zheng L, Zhao T, Sun LX. Research progress of the pharmacological action and pharmacokinetics of coumarins. *Shi Guo Guoy*. 2013;24.
21. Bairagi SH, Salaskar PP, Loke SD, Surve NN, Tandel DV, Dusara MD. Medicinal significance of coumarins: A review. *Int. J. Pharm. Res*. 2012;4(2):16-9.
22. Matos MJ, Santana L, Uriarte E, Abreu OA, Molina E, Yordi EG. Coumarins an important class of phytochemicals. *Phytochemicals isolation, characterisation and role in human health*. 2015 Sep 30;25:533-8.
23. Wang H, Lu X, Yao H, Feng J, Liu R. Research progress on application of coumarin and its derivatives. *Chemical Industry Times*. 2009;23(8):40-3
24. Matos MJ, Santana L, Uriarte E, Delogu G, Corda M, Fadda MB, et. al. New halogenated phenylcoumarins as tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2011 Jun 1;21(11):3342-5.
25. Agarwal P, Das C, Dias O, Shanbhag T. Antimicrobial property of Capsaicin. *Inter. Res. J. Biol. Sci*. 2017;6:7-11.
26. Wetheim HF. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infection. *Lancet Infect Dis*. 2005;5:751-62.

27. Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G, et. al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001–2002. *Journal of Infectious Diseases*. 2006 Jan 15;193(2):172-9.
28. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *New England journal of medicine*. 1998 Aug 20;339(8):520-32.
29. Grayson ML, Cosgrove SE, Crowe S, Hope W, McCarthy JS, Mills J, et. al. Kucers' The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, -Three Volume Set. CRC Press; 2017 Oct 2.
30. Faoagali JL, Thong ML, Grant D. Ten years' experience with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large Australian hospital. *Journal of Hospital Infection*. 1992 Feb 1;20(2):113-9.
31. Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, Sanza LT, Como-Sabetti K, Jernigan JA, et. al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *New England Journal of Medicine*. 2005 Apr 7;352(14):1436-44.
32. Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging infectious diseases*. 2005 Dec;11(12):1965.
33. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999 Jun 1;43(6):1449-58.
34. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et. al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Jama*. 2007 Oct 17;298(15):1763-71.
35. Vanhommerig E, Moons P, Pirici D, Lammens C, Hernalsteens JP, De Greve H, et. al. Comparison of biofilm formation between major clonal lineages of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *PloS one*. 2014 Aug 8;9(8):e104561.
36. Epstein L, Mu Y, Belflower R, Scott J, Ray S, Dumyati G, et. al. Risk factors for invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after recent discharge from an acute-care hospitalization, 2011–2013. *Clinical Infectious Diseases*. 2016 Jan 1;62(1):45-52.
37. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Talan DA. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *New England Journal of Medicine*. 2006 Aug 17;355(7):666-74.
38. Kazakova SV, Hageman JC, Matava M, Srinivasan A, Phelan L, Garfinkel B, et. al. A clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among professional football players. *N engl J med*. 2005 Feb 3;352:468-75.

39. Aiello AE, Lowy FD, Wright LN, Larson EL. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among US prisoners and military personnel: review and recommendations for future studies. *The Lancet infectious diseases*. 2006 Jun 1;6(6):335-41.
40. Drougka E, Foka A, Liakopoulos A, Doudoulakakis A, Jelastopulu E, Chini V, et. al. A 12-year survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Greece: ST80-IV epidemic?. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014 Nov 1;20(11):O796-803.
41. Van Alen S, Ballhausen B, Peters G, Friedrich AW, Mellmann A, Köck R, et. al. In the centre of an epidemic: Fifteen years of LA-MRSA CC398 at the University Hospital Münster. *Veterinary microbiology*. 2017 Feb 1;200:19-24.
42. Larsen J, Petersen A, Sørup M, Stegger M, van Alphen L, Valentiner-Branth P, et. al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 is an increasing cause of disease in people with no livestock contact in Denmark, 1999 to 2011. *Eurosurveillance*. 2015 Sep 17;20(37):30021.
43. Kluytmans JA, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical microbiology reviews*. 1997 Jul;10(3):505-20.
44. Sim BL, McBryde E, Street AC, Marshall C. Multiple site surveillance cultures as a predictor of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2013 Aug;34(8):818-24.
45. Eriksen NR, Espersen F, Rosdahl VT, Jensen K. Carriage of *Staphylococcus aureus* among 104 healthy persons during a 19-month period. *Epidemiology & Infection*. 1995 Aug;115(1):51-60.
46. Burian M, Rautenberg M, Kohler T, Fritz M, Krismer B, Unger C, et. al. Temporal expression of adhesion factors and activity of global regulators during establishment of *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *The Journal of infectious diseases*. 2010 May 1;201(9):1414-21.
47. Liu CM, Price LB, Hungate BA, Abraham AG, Larsen LA, Christensen K, et. al. *Staphylococcus aureus* and the ecology of the nasal microbiome. *Science advances*. 2015 Jun 5;1(5):e1400216.
48. Krismer B, Liebeke M, Janek D, Nega M, Rautenberg M, Hornig G, et. al. Nutrient limitation governs *Staphylococcus aureus* metabolism and niche adaptation in the human nose. *PLoS pathogens*. 2014 Jan 16;10(1):e1003862.
49. Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C, et.al. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature*. 2016 Jul;535(7613):511-6.

50. Kaspar U, Kriegeskorte A, Schubert T, Peters G, Rudack C, Pieper DH, et. al. The culturome of the human nose habitats reveals individual bacterial fingerprint patterns. *Environmental microbiology*. 2016 Jul;18(7):2130-42.
51. Krismer B, Weidenmaier C, Zipperer A, Peschel A. The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nature reviews microbiology*. 2017 Nov;15(11):675-87.
52. Boyle-Vavra S, Li X, Alam MT, Read TD, Sieth J, Cywes-Bentley C, et. al. USA300 and USA500 clonal lineages of *Staphylococcus aureus* do not produce a capsular polysaccharide due to conserved mutations in the *cap5* locus. *MBio*. 2015 Apr 7;6(2):e02585-14.
53. Spaan AN, van Strijp JA, Torres VJ. Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nature Reviews Microbiology*. 2017 Jul;15(7):435-47.
54. Laabei M, Recker M, Rudkin JK, Aldeljawi M, Gulay Z, Sloan TJ, et. al.. Predicting the virulence of MRSA from its genome sequence. *Genome research*. 2014 May 1;24(5):839-49.
55. Thammavongsa V, Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nature Reviews Microbiology*. 2015 Sep;13(9):529-43.
56. Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*. 1998 Dec 1;6(12):484-8.
57. Speziale P, Pietrocola G, Rindi S, Provenzano M, Provenza G, Di Poto A, et. al. Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future microbiology*. 2009 Dec;4(10):1337-52.
58. Maresso AW, Schneewind O. Sortase as a target of anti-infective therapy. *Pharmacological reviews*. 2008 Mar 1;60(1):128-41.
59. Flock JI, Fröman G, Jönsson K, Guss B, Signäs C, Nilsson B, et. al. Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *The EMBO journal*. 1987 Aug;6(8):2351-7.
60. Kreis T, Vale R, editors. Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins. Sambrook and Tooze Publications; 1999.
61. Cheung AL, Projan SJ, Gresham H. The genomic aspect of virulence, sepsis, and resistance to killing mechanisms in *Staphylococcus aureus*. *Current Infectious Disease Reports*. 2002 Sep;4(5):400-10.

62. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, et. al. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. Science. 2007 Feb 23;315(5815):1130-3.
63. Ratner AJ, Hippe KR, Aguilar JL, Bender MH, Nelson AL, Weiser JN. Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. Journal of Biological Chemistry. 2006 May 5;281(18):12994-8.
64. Husmann M, Dersch K, Bobkiewicz W, Beckmann E, Veerachato G, Bhakdi S. Differential role of p38 mitogen activated protein kinase for cellular recovery from attack by pore-forming S. aureus α -toxin or streptolysin O. Biochemical and biophysical research communications. 2006 Jun 16;344(4):1128-34.
65. Wardenburg JB, Schneewind O. Vaccine protection against Staphylococcus aureus pneumonia. The Journal of experimental medicine. 2008 Feb 18;205(2):287-94.
66. Rose F, Dahlem G, Guthmann B, Grimminger F, Maus U, Hänze J, et. al. Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by S. aureus α -toxin. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2002 Feb 1;282(2):L207-14.
67. Park PW, Foster TJ, Nishi E, Duncan SJ, Klagsbrun M, Chen Y. Activation of syndecan-1 ectodomain shedding by Staphylococcus aureus α -toxin and β -toxin. Journal of Biological Chemistry. 2004 Jan 2;279(1):251-8.
68. Bartlett AH, Foster TJ, Hayashida A, Park PW. α -Toxin facilitates the generation of CXC chemokine gradients and stimulates neutrophil homing in Staphylococcus aureus pneumonia. The Journal of infectious diseases. 2008 Nov 15;198(10):1529-35.
69. Hayashida A, Bartlett AH, Foster TJ, Park PW. Staphylococcus aureus beta-toxin induces lung injury through syndecan-1. The American journal of pathology. 2009 Feb 1;174(2):509-18.
70. Below S, Konkel A, Zeeck C, Müller C, Kohler C, Engelmann S, et. al. Virulence factors of Staphylococcus aureus induce Erk-MAP kinase activation and c-Fos expression in S9 and 16HBE14o-human airway epithelial cells. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2009 Mar;296(3):L470-9.
71. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, et. al. Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. The Lancet. 2002 Mar 2;359(9308):753-9.
72. Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Brück M, Holzinger D, Varga G, et. al. Staphylococcus aureus panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. PLoS pathogens. 2010 Jan 8;6(1):e1000715.

73. Genestier AL, Michallet MC, Prévost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, et. al. Staphylococcus aureus Pantón-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *The Journal of clinical investigation*. 2005 Nov 1;115(11):3117-27.
74. Miles G, Movileanu L, Bayley H. Subunit composition of a bicomponent toxin: staphylococcal leukocidin forms an octameric transmembrane pore. *Protein Science*. 2002 Apr;11(4):894-902.
75. Otto M. 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*. 2013 Jan;35(1):4-11.
76. O'gara JP, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *Journal of medical microbiology*. 2001 Jul 1;50(7):582-7.
77. Minaev BF. Electronic mechanisms of activation of molecular oxygen. *Russian Chemical Reviews*. 2007 Nov 30;76(11):989.
78. Hammond AA, Miller KG, Kruczek CJ, Dertien J, Colmer-Hamood JA, Griswold JA, et. al. An in vitro biofilm model to examine the effect of antibiotic ointments on biofilms produced by burn wound bacterial isolates. *Burns*. 2011 Mar 1;37(2):312-21.
79. Nethercott C, Mabbett AN, Totsika M, Peters P, Ortiz JC, Nimmo GR, et. al. Molecular characterization of endocarditis-associated *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*. 2013 Jul;51(7):2131-8.
80. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*. 2010 Apr 1;35(4):322-32.
81. Joo HS, Otto M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chemistry & biology*. 2012 Dec 21;19(12):1503-13.
82. Geoghegan JA, Corrigan RM, Gruszka DT, Speziale P, O'Gara JP, Potts JR, et. al. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. 2010 Nov 1;192(21):5663-73.
83. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, Loughman A, et. al. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *Journal of bacteriology*. 2008 Jun 1;190(11):3835-50.

84. Cramton SE, Ulrich M, Götz F, Döring G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and immunity*. 2001 Jun 1;69(6):4079-85.
85. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Molecular microbiology*. 1996 Jun;20(5):1083-91.
86. Rohde H, Frankenberger S, Zähringer U, Mack D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *European journal of cell biology*. 2010 Jan 1;89(1):103-11.
87. Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of bacteriology*. 2002 Aug 15;184(16):4400-8.
88. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and immunity*. 1999 Oct 1;67(10):5427-33.
89. Rohde H, Knobloch JK, Horstkotte MA, Mack D. Correlation of *Staphylococcus aureus* *icaADBC* genotype and biofilm expression phenotype. *Journal of clinical microbiology*. 2001 Dec 1;39(12):4595-6.
90. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology*. 2001 May 1;183(9):2888-96.
91. Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, et. al. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of bacteriology*. 2004 Jul 15;186(14):4665-84.
92. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Apr;43(4):1973-6.
93. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA, et. al. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *Journal of clinical microbiology*. 2007 May;45(5):1379-88.
94. Houston P, Rowe SE, Pozzi C, Waters EM, O'Gara JP. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infection and immunity*. 2011 Mar;79(3):1153-65.

95. Mempel M, Feucht H, Ziebuhr W, Endres M, Laufs R, Grüter L. Lack of *mecA* transcription in slime-negative phase variants of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994 Jun;38(6):1251-5.
96. Mempel M, Müller E, Hoffmann R, Feucht H, Laufs R, Grüter L. Variable degree of slime production is linked to different levels of beta-lactam susceptibility in *Staphylococcus epidermidis* phase variants. *Medical microbiology and immunology*. 1995 Oct;184(3):109-13.
97. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. Environmental regulation of biofilm development in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Journal of hospital infection*. 2006 Jan 1;62(1):120-2.
98. Karlsson A, Saravia-Otten P, Tegmark K, Morfeldt E, Arvidson S. Decreased amounts of cell wall-associated protein A and fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* *sarA* mutants due to up-regulation of extracellular proteases. *Infection and immunity*. 2001 Aug 1;69(8):4742-8.
99. Martí M, Trotonda MP, Tormo-Más MÁ, Vergara-Irigaray M, Cheung AL, Lasa I, et al. Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes and infection*. 2010 Jan 1;12(1):55-64.
100. Shaw L, Golonka E, Potempa J, Foster SJ. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*. 2004 Jan 1;150(1):217-28.
101. McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara JP. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2015 Jan 28;5:1.
102. Pozzi C, Waters EM, Rudkin JK, Schaeffer CR, Lohan AJ, Tong P, et. al. Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. *PLoS pathogens*. 2012 Apr 5;8(4):e1002626.
103. Rudkin JK, Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Pozzi C, Waters EM, et. al. Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the *agr* quorum sensing system. *Journal of Infectious Diseases*. 2012 Mar 1;205(5):798-806.
104. Ray S, Maunsell JH. Different origins of gamma rhythm and high-gamma activity in macaque visual cortex. *PLoS biology*. 2011 Apr 12;9(4):e1000610.
105. Mwangi MM, Kim C, Chung M, Tsai J, Vijayadamodar G, Benitez M, et. al. Whole-genome sequencing reveals a link between β -lactam resistance and synthetases of the alarmone (p) ppGpp in *Staphylococcus aureus*. *Microbial Drug Resistance*. 2013 Jun 1;19(3):153-9.

106. Dordel J, Kim C, Chung M, Pardos de la Gandara M, Holden MT, Parkhill J, et. al. 2014. Novel determinants of antibiotic resistance: identification of mutated loci in highly methicillin-resistant subpopulations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *mBio*;5(2):e01000.
107. Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *New England Journal of Medicine*. 2001 Jan 4;344(1):11-6.
108. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews microbiology*. 2014 Jan;12(1):49-62.
109. Spaan AN, Surewaard BG, Nijland R, Van Strijp JA. Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: a biological tug of war. *Annual review of microbiology*. 2013 Sep 8;67:629-50.
110. Hanzelmann D, Joo HS, Franz-Wachtel M, Hertlein T, Stevanovic S, Macek B, et. al. Toll-like receptor 2 activation depends on lipopeptide shedding by bacterial surfactants. *Nature communications*. 2016 Jul 29;7(1):1-1.
111. Cheng AG, DeDent AC, Schneewind O, Missiakas D. A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. *Trends in microbiology*. 2011 May 1;19(5):225-32.
112. Laarman A, Milder F, van Strijp J, Rooijackers S. Complement inhibition by gram-positive pathogens: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Journal of molecular medicine*. 2010 Feb;88(2):115-20.
113. Stapels DA, Ramyar KX, Bischoff M, von Köckritz-Blickwede M, Milder FJ, Ruyken M, et. al. *Staphylococcus aureus* secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014 Sep 9;111(36):13187-92.
114. Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DY, Schlievert PM. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clinical microbiology reviews*. 2013 Jul;26(3):422-47.
115. Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M. *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium. *Thrombosis and haemostasis*. 2005;94(08):278-85.
116. Weidenmaier C, Peschel A, Xiong YQ, Kristian SA, Dietz K, Yeaman MR, et. al. Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *Journal of infectious diseases*. 2005 May 15;191(10):1771-7.

117. Löffler B, Tuchscher L, Niemann S, Peters G. Staphylococcus aureus persistence in non-professional phagocytes. *International Journal of Medical Microbiology*. 2014 Mar 1;304(2):170-6.
118. Thomer L, Schneewind O, Missiakas D. Pathogenesis of Staphylococcus aureus bloodstream infections. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2016 May 23;11:343-64.
119. Harding K. Understanding healing after skin breakdown. *Skin breakdown—the silent epidemic*. 2007:13-6.
120. Voegeli D, Posnett J, Franks P, Harding K, Edmonds M, Moffatt C, et. al. Skin breakdown: the silent epidemic.
121. International consensus. Optimising wellbeing in people living with a wound. An expert working group review. London: Wounds International, 2012. Available from: <http://www.woundsinternational.com>.
122. Posnett J, Gottrup F, Lundgren H, Saal G. The resource impact of wounds on health-care providers in Europe. *Journal of wound care*. 2009 Apr;18(4):154-.
123. Troxler M, Vowden K, Vowden P. Integrating adjunctive therapy into practice: the importance of recognising ‘hard-to-heal’wounds. *World wide wounds*. 2006 Dec;32(1):99-105.
124. Jørgensen SF, Nygaard R, Posnett J. Meeting the challenges of wound care in Danish home care. *journal of wound care*. 2013 Oct;22(10):540-5.
125. Gottrup F, Henneberg E, Trangbaek R, Bækmark N, Zøllner K, Sørensen J. Point prevalence of wounds and cost impact in the acute and community setting in Denmark. *journal of wound care*. 2013 Aug;22(8):413-22.
126. Drew P, Posnett J, Rusling L, Wound Care Audit Team. The cost of wound care for a local population in England. *International Wound Journal*. 2007 Jun;4(2):149-55.
127. Srinivasaiah N, Dugdall H, Barrett S, Drew PJ. A point prevalence survey of wounds in north-east England. *Journal of wound care*. 2007 Oct;16(10):413-9.
128. Lindholm C, Andersson H, Fossum B, Jörbeck H. Wounds scrutiny in a Swedish hospital: prevalence, nursing care and bacteriology, including MRSA. *Journal of wound care*. 2005 Jul;14(7):313-9.
129. The European Wound Management Association 2015
http://ewma.org/fileadmin/user_upload/EWMA/pdf/EWMA_Projects/090923_Wound_Care_Brochure_final.pdf.

130. Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK, et. al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound repair and regeneration*. 2009 Nov;17(6):763-71.
131. Santamaria N, Carville K, Prentice J. Woundswest: Identifying the prevalence of wounds within western Australia's public health system. *EWMA Journal*. 2009 Oct 1;9(3).
132. Bermark S. Prevalence investigation of pressure ulcers. *EWMA J*. 2004;4:7-11.
133. Goldman R. Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Advances in skin & wound care*. 2004 Jan 1;17(1):24-35.
134. Kim WJ, Gittes GK, Longaker MT. Signal transduction in wound pharmacology. *Archives of pharmacal research*. 1998 Oct;21(5):487-95.
135. Lewis T, Grant RT. Vascular reactions of the skin to injury. Part II. The liberation of a histamine-like substance in injured skin; the underlying cause of factitious urticaria and of wheals produced by burning; and observations upon the nervous control of certain skin reactions. *Heart*. 1924 May 16;11(May):209-65.
136. O'Leary JP, Tabuenca A, Capote LR, editors. *The physiologic basis of surgery*. Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
137. Raja SK, Garcia MS, Isseroff RR. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci*. 2007 May 1;12(3):2849-68.
138. Schulz C, Perdiguero EG, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et. al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*. 2012 Apr 6;336(6077):86-90.
139. Lech M, Anders HJ. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular basis of disease*. 2013 Jul 1;1832(7):989-97.
140. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*. 2008 Sep;16(5):585-601.
141. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*. 1999 Sep 2;341(10):738-46.
142. George Broughton II, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plastic and reconstructive surgery*. 2006 Jun 1;117(7S):1e-S.
143. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *European surgical research*. 2012;49(1):35-43.

144. Chung K. Grabb and Smith's plastic surgery. Lippincott Williams & Wilkins; 2019 May 1.
145. Geever EF, Stein JM, Levenson SM. Variations in breaking strength in healing wounds of young guinea pigs. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 1965 Sep 1;5(5):624-35.
146. Romo T, Pearson JM, Yalamanchili H, al. e. Wound healing, skin 2016 [Available from: <http://www.emedicine.com/ent/topics13.htm>].
147. Boughey, A. S., and C. B. Heiser. "Nightshades." *BioScience*, vol. 20, no. 17, American Institute of Biological Sciences, Oxford University Press, 1970, pp. 979–979, <https://doi.org/10.2307/1295616>.
148. Penella C, Calatayud A. Pepper crop under climate change: Grafting as an environmental friendly strategy. *Climate Resilient Agriculture: Strategies and Perspectives*. IntechOpen, London. 2018 Feb 21:129-55.
149. Tridge. 2019. <http://www.tridge.com/intelligences/other-chili-pepper/export>.
150. Nelson EK, Dawson LE. The constitution of capsaicin, the pungent principle of Capsicum. III. *Journal of the American Chemical Society*. 1923 Sep;45(9):2179-81.
151. Späth E, Darling SF. Synthese des capsaicins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*. 1930 Mar 5;63(3):737-43.
152. Harris PA, Taylor R, Minor BL, Elliott V, Fernandez M, O'Neal L, et. al . The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners. *Journal of biomedical informatics*. 2019 Jul 1;95:103208.
153. Barbero GF, Palma M, Barroso CG. Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction–high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica chimica acta*. 2006 Sep 25;578(2):227-33.
154. Chapa-Oliver AM, Mejía-Teniente L. Capsaicin: From plants to a cancer-suppressing agent. *Molecules*. 2016 Aug;21(8):931.
155. Sasson A. Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological and economic. *Biotechnology: Economic and Social Aspects: Issues for Developing Countries*. 1992 Apr 30:81.
156. Fattorusso E, Tagliatela-Scafati O, editors. *Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis, and biology*. John Wiley & Sons; 2007 Dec 3.
157. Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev*. 1991;43:143-201.

158. Singh H, Fairs G, Syarhabil M. Anti-fungal activity of *Capsicum frutescence* and *Zingiber officinale* against key post-harvest pathogens in citrus. In International Conference on Biomedical Engineering and Technology, IPCBEE 2011 (Vol. 11, pp. 1-6).
159. Akyuz L, Kaya M, Mujtaba M, Ilk S, Sargin I, Salaberria AM, et. al. Supplementing capsaicin with chitosan-based films enhanced the anti-quorum sensing, antimicrobial, antioxidant, transparency, elasticity and hydrophobicity. International journal of biological macromolecules. 2018 Aug 1;115:438-46.
160. Graham DY, Anderson SY, Lang T. Garlic or jalapeno peppers for treatment of *Helicobacter pylori* infection. The American journal of gastroenterology. 1999 May 1;94(5):1200-2.
161. Lee IO, Lee KH, Pyo JH, Kim JH, Choi YJ, Lee YC. Anti-inflammatory effect of capsaicin in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. Helicobacter. 2007 Oct;12(5):510-7.
162. Santos MM, Vieira-da-Motta O, Vieira IJ, Braz-Filho R, Gonçalves PS, Maria EJ, et. al. Antibacterial activity of *Capsicum annuum* extract and synthetic capsaicinoid derivatives against *Streptococcus mutans*. Journal of natural medicines. 2012 Apr;66(2):354-6.
163. Zhou Y, Guan X, Zhu W, Liu Z, Wang X, Yu H, et. al. Capsaicin inhibits *Porphyromonas gingivalis* growth, biofilm formation, gingivomucosal inflammatory cytokine secretion, and in vitro osteoclastogenesis. European journal of clinical microbiology & infectious diseases. 2014 Feb;33(2):211-9.
164. Adaszek Ł, Gadomska D, Mazurek Ł, Łyp P, Madany J, Winiarczyk S. Properties of capsaicin and its utility in veterinary and human medicine. Research in Veterinary Science. 2019 Apr 1;123:14-9.
165. Molina-Torres J, García-Chávez A, Ramírez-Chávez E. Antimicrobial properties of alkalamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. Journal of ethnopharmacology. 1999 Mar 1;64(3):241-8.
166. Veloso J, Prego C, Varela MM, Carballeira R, Bernal A, Merino F, et. al. Properties of capsaicinoids for the control of fungi and oomycetes pathogenic to pepper. Plant Biology. 2014 Jan;16(1):177-85.
167. de Arauz LJ, Jozala AF, Mazzola PG, Penna TC. Nisin biotechnological production and application: a review. Trends in Food Science & Technology. 2009 Apr 1;20(3-4):146-54.
168. Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J. Applications of the bacteriocin, nisin. Antonie Van Leeuwenhoek. 1996 Feb;69(2):193-202.

169. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 2005 Oct;3(10):777-88.
170. Gross E, Morell JL. Presence of dehydroalanine in the antibiotic nisin and its relation to activity. *Journal of the American Chemical Society*. 1967 May;89(11):2791-2.
171. Smith L, Hillman JD. Therapeutic potential of type A (I) lantibiotics, a group of cationic peptide antibiotics. *Current opinion in microbiology*. 2008 Oct 1;11(5):401-8.
172. Shin JM, Ateia I, Paulus JR, Liu H, Fenno JC, Rickard AH, et. al. Antimicrobial nisin acts against saliva derived multi-species biofilms without cytotoxicity to human oral cells. *Frontiers in microbiology*. 2015 Jun 18;6:617.
173. Sahl HG, Jack RW, Bierbaum G. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *European Journal of Biochemistry*. 1995 Jun;230(3):827-53.
174. Wiedemann I, Breukink E, van Kraaij C, Kuipers OP, Bierbaum G, de Kruijff B, et. al. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Jan 19;276(3):1772-9.
175. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology*. 2001 Dec 4;71(1):1-20.
176. Kamarajan P, Hayami T, Matte B, Liu Y, Danciu T, Ramamoorthy A, et. al. Nisin ZP, a bacteriocin and food preservative, inhibits head and neck cancer tumorigenesis and prolongs survival. *PloS one*. 2015 Jul 1;10(7):e0131008.
177. Venugopala KN, Rashmi V, Odhav B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed research international*. 2013 Oct;2013.
178. Murray RD. Naturally occurring plant coumarins. In *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 1978 (pp. 199-429). Springer, Vienna.
179. Matos MJ, Vazquez-Rodriguez S, Santana L, Uriarte E, Fuentes-Edfuf C, Santos Y, et. al. Synthesis and structure-activity relationships of novel amino/nitro substituted 3-aryl coumarins as antibacterial agents. *Molecules*. 2013 Feb;18(2):1394-404.
180. Monga Paramjeet K, Sharma D, Dubey A. Comparative study of microwave and con-ventional synthesis and pharmacological activity of coumarins *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2012;4(1):822-50.

181. Kapoor S. The anti-neoplastic effects of coumarin: an emerging concept. *Cytotechnology*. 2013 Oct;65(5):787-8.
182. Kontogiorgis C, Detsi A, Hadjipavlou-Litina D. Coumarin-based drugs: a patent review (2008–present). *Expert opinion on therapeutic patents*. 2012 Apr 1;22(4):437-54.
183. Song Y, Chen Z, Li H. Advances in coumarin-derived fluorescent chemosensors for metal ions. *Current Organic Chemistry*. 2012 Nov 1;16(22):2690-707.
184. Barcellona D, Vannini ML, Fenu L, Balestrieri C, Marongiu F. Warfarin or acenocoumarol: which is better in the management of oral anticoagulants?. *Thrombosis and haemostasis*. 1998;80(12):899-902.
185. Gómez-Outes A, Luisa Suarez-Gea M, Calvo-Rojas G, Lecumberri R, Rocha E, Pozo-Hernández C, et. al. Discovery of anticoagulant drugs: a historical perspective. *Current drug discovery technologies*. 2012 Jun 1;9(2):83-104.
186. Schalekamp T, de Boer A. Pharmacogenetics of oral anticoagulant therapy. *Current pharmaceutical design*. 2010 Jan 1;16(2):187-203.
187. Milatová E, Milata V. Warfarin-its synthesis and properties in a twenty-year retrospective*. *Ceska a Slovenska farmacie: casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti*. 2013 Jun 1;62(3):111-9.
188. Beinema M, Brouwers JR, Schalekamp T, Wilffert B. Pharmacogenetic differences between warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon. *Thrombosis and haemostasis*. 2008;100(12):1052-7.
189. Anand P, Singh B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of pharmacal research*. 2013 Apr;36(4):375-99.
190. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, et. al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research*. 1988 Feb 1;48(3):589-601.
191. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
192. Chovanová R, Mikulášová M, Vaverková Š. Modulation of *mecA* gene expression by essential oil from *Salvia sclarea* and synergism with oxacillin in methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* carrying different types of staphylococcal chromosomal cassette *mec*. *International Journal of Microbiology*. 2016 Jan 6;2016.

193. Jiang H, Luan Z, Fan Z, Wu X, Xu Z, Zhou T, et. al. Antibacterial, Antibiofilm, and Antioxidant Activity of Polysaccharides Obtained from Fresh *Sarcotesta* of *Ginkgo biloba*: Bioactive Polysaccharide that Can Be Exploited as a Novel Biocontrol Agent. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2021 Jun 16;2021.
194. Cheung GY, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 2021 Jan 1;12(1):547-69.
195. Rasigade JP, Dumitrescu O, Lina G. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014 Jul 1;20(7):587-8.
196. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler Jr VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*. 2015 Jul;28(3):603-61.
197. Van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical microbiology reviews*. 2012 Apr;25(2):362-86.
198. Kourtis AP, Hatfield K, Baggs J, Mu Y, See I, Epton E, et. al. Emerging Infections Program MRSA Author Group: vital signs: epidemiology and recent trends in methicillin-resistant and in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections-United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2019;68:214-9.
199. McCaig LF, McDonald LC, Mandal S, Jernigan DB. *Staphylococcus aureus*—associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. *Emerging infectious diseases*. 2006 Nov;12(11):1715.
200. Nakamura Y, Oscherwitz J, Cease KB, Chan SM, Muñoz-Planillo R, Hasegawa M, et. al. *Staphylococcus* δ -toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature*. 2013 Nov;503(7476):397-401.
201. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et. al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*. 2019 Apr;17(4):203-18.
202. Ippolito G, Leone S, Lauria FN, Nicastrì E, Wenzel RP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug. *International journal of infectious diseases*. 2010 Oct 1;14:S7-11.
203. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et. al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International journal of antimicrobial agents*. 2012 Apr 1;39(4):273-82.

204. Hu FP, Guo Y, Zhu DM, Wang F, Jiang XF, Xu YC, et. al. Resistance trends among clinical isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance, 2005–2014. *Clinical microbiology and infection*. 2016 Mar 1;22:S9-14.
205. Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Leptidis J, Korbila IP. MRSA in Africa: filling the global map of antimicrobial resistance. *PloS one*. 2013 Jul 29;8(7):e68024.
206. Bouiller K, Bertrand X, Hocquet D, Chirouze C. Human infection of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* CC398: a review. *Microorganisms*. 2020 Nov;8(11):1737.
207. Kavanagh KT. Control of MSSA and MRSA in the United States: protocols, policies, risk adjustment and excuses. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2019 Dec;8(1):1-8.
208. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*. 2003 May 1;111(9):1265-73.
209. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Focus: infectious diseases: vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Yale journal of biology and medicine*. 2017 Jun;90(2):269.
210. Hiramatsu K, Kayayama Y, Matsuo M, Aiba Y, Saito M, Hishinuma T, et. al. Vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2014 Dec 1;2(4):213-24.
211. Fluit AC. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012 Aug 1;18(8):735-44.
212. Desai R, Pannaraj PS, Agopian J, Sugar CA, Liu GY, Miller LG. Survival and transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from fomites. *American journal of infection control*. 2011 Apr 1;39(3):219-25.
213. Senn L, Clerc O, Zanetti G, Basset P, Prod'hom G, Gordon NC, et. al. The stealthy superbug: the role of asymptomatic enteric carriage in maintaining a long-term hospital outbreak of ST228 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MBio*. 2016 Jan 19;7(1):e02039-15.
214. Acton DS, Tempelmans Plat-Sinnige MJ, van Wamel W, de Groot N, van Belkum A. Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact?. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2009 Feb;28(2):115-27.
215. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et. al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018 Mar 1;18(3):318-27.

216. Zhou LL, Yang CG. Chemical intervention on *Staphylococcus aureus* virulence. *Chinese Journal of Chemistry*. 2019 Feb;37(2):183-93.
217. Füchtbauer S, Mousavi S, Bereswill S, Heimesaat MM. Antibacterial properties of capsaicin and its derivatives and their potential to fight antibiotic resistance—A literature survey. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2021 Mar 30;11(1):10-7.
218. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2010 Sep;74(3):417-33.
219. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert review of anti-infective therapy*. 2014 Oct 1;12(10):1221-36.
220. Daubin V, Szöllösi GJ. Horizontal gene transfer and the history of life. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016 Apr 1;8(4):a018036.
221. Wright GD. The origins of antibiotic resistance. *Antibiotic resistance*. 2012:13-30.
222. Laws M, Shaaban A, Rahman KM. Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS Microbiology Reviews*. 2019 Sep;43(5):490-516.
223. Davies J. Where have all the antibiotics gone?. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2006 Sep 1;17(5):287-90.
224. WHO-2019.
<https://www.developmentaid.org/api/frontend/cms/file/2020/01/9789240000193-eng.pdf>.
225. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et. al. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*. 2009 Jan 1;48(1):1-2.
226. Fattori V, Hohmann MS, Rossaneis AC, Pinho-Ribeiro FA, Verri WA. Capsaicin: current understanding of its mechanisms and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses. *Molecules*. 2016 Jul;21(7):844.
227. Gonzalez-Mondragon EG, Vazquez-Tzompantzi E. Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2011 Jan 28;16(2):1253-70.
228. Luo XJ, Peng J, Li YJ. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European journal of pharmacology*. 2011 Jan 10;650(1):1-7.

229. Omolo MA, Wong ZZ, Mergen K, Hastings JC, Le NC, Reil HA, et. al. Antimicrobial properties of chili peppers. *Journal of Infectious Diseases and Therapy*. 2014 Jun 6.
230. Di Braccio M, Grossi G, Roma G, Signorello MG, Leoncini G. Synthesis and in vitro inhibitory activity on human platelet aggregation of novel properly substituted 4-(1-piperazinyl) coumarins. *European journal of medicinal chemistry*. 2004 May 1;39(5):397-409.
231. Curini M, Epifano F, Maltese F, Marcotullio MC, Tubaro A, Altinier G, et. al. Synthesis and anti-inflammatory activity of natural and semisynthetic geranyloxycoumarins. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2004 May 3;14(9):2241-3.
232. Ito C, Itoigawa M, Furukawa H, Tokuda H, Okuda Y, Mukainaka T, et. al. Anti-tumor-promoting effects of 8-substituted 7-methoxycoumarins on Epstein-Barr virus activation assay. *Cancer letters*. 1999 Apr 26;138(1-2):87-92.
233. Thakur S, Ray S, Jhunjhunwala S, Nandi D. Insights into coumarin-mediated inhibition of biofilm formation in *Salmonella Typhimurium*. *Biofouling*. 2020 Apr 20;36(4):479-91.
234. Balcioğlu S, Karataş MO, Ateş B, Alici B, Özdemir İ. Therapeutic potential of coumarin bearing metal complexes: Where are we headed?. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2020 Jan 15;30(2):126805.
235. Tanimoto A, Witaicenis A, Caruso ÍP, Piva HM, Araujo GC, Moraes FR, et. al. 4-Methylesculetin, a natural coumarin with intestinal anti-inflammatory activity, elicits a glutathione antioxidant response by different mechanisms. *Chemico-Biological Interactions*. 2020 Jan 5;315:108876.
236. Zhang L, Xu Z. Coumarin-containing hybrids and their anticancer activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019 Nov 1;181:111587.
237. Najafi Z, Mahdavi M, Saeedi M, Karimpour-Razkenari E, Edraki N, Sharifzadeh M, et. al. Novel tacrine-coumarin hybrids linked to 1, 2, 3-triazole as anti-Alzheimer's compounds: In vitro and in vivo biological evaluation and docking study. *Bioorganic chemistry*. 2019 Mar 1;83:303-16.
238. Shukla S, Gahlot P, Khandekar A, Agrawal A, Pasricha S. Exploring coumarin and chalcone analogues as potential antimycobacterial agents. *Anti-Infective Agents*. 2017 Aug 1;15(2):69-86.
239. Prusty JS, Kumar A. Coumarins: antifungal effectiveness and future therapeutic scope. *Molecular Diversity*. 2020 Nov;24(4):1367-83.

240. Feng LS, Xu Z, Chang L, Li C, Yan XF, Gao C, et. al. Hybrid molecules with potential in vitro antiplasmodial and in vivo antimalarial activity against drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Medicinal Research Reviews*. 2020 May;40(3):931-71.
241. Zhu M, Ma L, Wen J, Dong B, Wang Y, Wang Z, et. al. Rational design and Structure– Activity relationship of coumarin derivatives effective on HIV-1 protease and partially on HIV-1 reverse transcriptase. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020 Jan 15;186:111900.
242. Singh H, Singh JV, Bhagat K, Gulati HK, Sanduja M, Kumar N, et. al. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for therapeutic coumarin hybrids. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2019 Aug 15;27(16):3477-510.
243. Kumar S, Mukesh K, Harjai K, Singh V. Synthesis of coumarin based Knoevenagel-Ugi adducts by a sequential one pot five-component reaction and their biological evaluation as anti-bacterial agents. *Tetrahedron Letters*. 2019 Jan 3;60(1):8-12.
244. Ostrowska K. Coumarin-piperazine derivatives as biologically active compounds. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2020 Feb 1;28(2):220-32.
245. Xiao J, Sun Z, Kong F, Gao F. Current scenario of ferrocene-containing hybrids for antimalarial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020 Jan 1;185:111791.
246. Vanden Broeck A, McEwen AG, Chebaro Y, Potier N, Lamour V. Structural basis for DNA Gyrase interaction with coumermycin A1. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2019 Mar 28;62(8):4225-31.
247. Jozala AF, de Lencastre Novaes LC, Mazzola PG, Oliveira-Nascimento L, Penna TC, Teixeira JA, et. al. Low-cost purification of nisin from milk whey to a highly active product. *Food and Bioproducts Processing*. 2015 Jan 1;93:115-21.
248. Gharsallaoui A, Oulahal N, Joly C, Degraeve P. Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2016 Jun 10;56(8):1262-74.
249. Lopes NA, Brandelli A. Nanostructures for delivery of natural antimicrobials in food. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2018 Sep 2;58(13):2202-12.
250. Nguyen T, Brody H, Lin GH, Rangé H, Kuraji R, Ye C, et. al. Probiotics, including nisin-based probiotics, improve clinical and microbial outcomes relevant to oral and systemic diseases. *Periodontology 2000*. 2020 Feb;82(1):173-85.
251. Okuda KI, Zendo T, Sugimoto S, Iwase T, Tajima A, Yamada S, et. al. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013 Nov;57(11):5572-9.

252. Mathur H, Field D, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2018 Apr 19;4(1):1-3.
253. Kajwadkar R, Shin JM, Lin GH, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. High-purity nisin alone or in combination with sodium hypochlorite is effective against planktonic and biofilm populations of *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics*. 2017 Jun 1;43(6):989-94.
254. Pinheiro ET, Karygianni L, Attin T, Thurnheer T. Antibacterial Effect of High-Purity Nisin Alone and in Combination with D-Amino Acids or Chlorhexidine in an Endodontic-Like Biofilm Model. *Antibiotics*. 2021 Feb;10(2):149.
255. Heckler C, SANT'ANNA VO, Brandelli A, Malheiros PS. Combined effect of carvacrol, thymol and nisin against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Enteritidis*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2021 Nov 1;93.
256. Foster TJ. The MSCRAMM family of cell-wall-anchored surface proteins of gram-positive cocci. *Trends in microbiology*. 2019 Nov 1;27(11):927-41.
257. Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Applied and environmental microbiology*. 2008 Jan 15;74(2):470-6.
258. Vinogradov E, Sadovskaya I, Li J, Jabbouri S. Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus aureus* MN8m, a biofilm forming strain. *Carbohydrate research*. 2006 May 1;341(6):738-43.
259. Corrigan RM, Rigby D, Handley P, Foster TJ. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology*. 2007 Aug 1;153(8):2435-46.
260. Mootz JM, Malone CL, Shaw LN, Horswill AR. Staphopains modulate *Staphylococcus aureus* biofilm integrity. *Infection and immunity*. 2013 Sep;81(9):3227-38.
261. Hanke ML, Kielian T. Deciphering mechanisms of staphylococcal biofilm evasion of host immunity. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012 May 8;2:62.
262. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*. 2002 Jul 5;51(26):565-7.

263. Diekema DJ, BootsMiller BJ, Vaughn TE, Woolson RF, Yankey JW, Ernst EJ, et. al. Antimicrobial resistance trends and outbreak frequency in United States hospitals. *Clinical infectious diseases*. 2004 Jan 1;38(1):78-85.
264. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical microbiology reviews*. 1997 Oct;10(4):781-91.
265. Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM. Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006 Mar 1;57(3):450-60.
266. Lyon BR, Skurray RO. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiological reviews*. 1987 Mar;51(1):88-134.



8.EKLER

EK-1:

Evrak Tarih ve Sayısı: 28/05/2020-E.23207



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı :40595970-050.99-
Konu :Prof. Dr. Nizami DURAN

SAYIN PROF.DR. NİZAMİ DURAN
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI ÖĞRETİM ÜYESİ

Kurulumuzun 23/03/2020 tarihli toplantısında almış olduğu 2020/03-11 numaralı karar aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof.Dr. İlker YAVAŞ
Kurul Başkanı

KARAR 2020/03-12 Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nizami DURAN'ın (Tıbbi Mikrobiyoloji AD) yürütücüsü olduğu ve Arş. Gör. Dr. Burçin ÇİV'in (Tıbbi Mikrobiyoloji AD) ortak çalışmaları "*MRSA Etkenli Yara Enfeksiyonlarında Yeni Tedavi Stratejilerinin Araştırılması*" adlı proje Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine uygun bulunarak onaylanmasına oybirliğiyle karar verilmiştir.

9. ÖZGEÇMİŞ

■■■■■ ■■■■■ ilçesinde ■■■■ yılında doğdum. İlköğretim, lise öğrenimini İskenderun'da tamamladım. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi'ni kazandım. 2014-2017 yıllarında farklı uzmanlık dallarında asistanlık yaptım. Son olarak 2017 yılında Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Mikrobiyoloji Bölümünde asistanlığa başladım. 2019 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Mikrobiyoloji Bölümünde asistanlık yapmak üzere yatay geçiş yaptım .