



Punikalaginın Kolistin Dirençli *Acinetobacter baumannii* Suşlarına Karşı Tek Başına ve Kolistin ile Kombinasyon Halinde Antimikrobiyal Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Elif Odabaş Köse*

Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Antalya, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-3943-571X), elifkose@akdeniz.edu.tr, elifkose@gmail.com

(International Conference on Design, Research and Development (RDCONF) 2021 – 15-18 December 2021)

(DOI: 10.31590/ejosat.1041147)

ATIF/REFERENCE: Odabaş Köse E (2021). Punikalaginın Kolistin Dirençli *Acinetobacter baumannii* Suşlarına Karşı Tek Başına ve Kolistin ile Kombinasyon Halinde Antimikrobiyal Aktivitesinin Değerlendirilmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (32), 670-674.

Öz

Bu çalışmanın amacı, punikalaginın tek başına ve kolistin ile kombinasyon halinde antimikrobiyal aktivitesini kolistine dirençli *A. baumannii* suşları üzerinde değerlendirmektir. Çalışmada test edilmek üzere beş adet kolistine dirençli *A. baumannii* suşu kullanılmıştır. Suşlara karşı punikalagin ve kolistinin antimikrobiyal aktivitelerini saptamak için sıvı mikrodilüsyon testi yapılarak Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Bu iki ajanın kombinasyon aktiviteleri ise Dama Tahtası (Checkerboard) Sinerji Testi ile değerlendirilmiştir. Sıvı mikrodilüsyon testinin sonuçlarına göre tüm suşlara karşı punikalaginın MİK değeri 256 µg/ml, kolistinin MİK değerleri ise iki suşta 32 µg/ml, diğer üç suşta 8 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Checkerboard sinerji testi ile kombinasyon etkileşimlerinin belirlenmesinde Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon İndeksi (FİKİ) hesaplanmıştır. Buna göre kolistin ve punikalagin kombinasyonunun FİKİ değerleri iki suş için 1.12, diğer üç suş için ise 1.03 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, punikalagin kolistin dirençli *A. baumannii* suşları üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Kolistin ile kombinasyonunun ise tüm test edilen suşlar üzerinde indiferan etkili olduğu tespit edilmiştir. Hiçbir suş üzerinde sinerjistik etki gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra herhangi bir antagonistik etki de saptanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, kolistin, punikalagin, indiferan etki

Evaluation of the Antimicrobial Activity of Punicalagin Alone and in Combination with Colistin Against Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains

Abstract

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of punicalagin alone and in combination with colistin on colistin-resistant *A. baumannii* strains. Five colistin-resistant *A. baumannii* strains were used to be tested in the study. Broth microdilution test was performed to evaluate the antimicrobial activities of punicalagin and colistin against strains and Minimum Inhibition Concentrations (MIC) were determined. Combination activities of these two agents were evaluated with the Checkerboard Synergy Test. According to the results of the broth microdilution test, the MIC value of punicalagin against all strains was 256 µg/ml, the MIC values of colistin were found to be 32 µg/ml on two strains and 8 µg/ml on the other three strains. The Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) was calculated to determine combination interactions with the Checkerboard synergy test. Accordingly, the FICI values of the combination of colistin and punicalagin were found as 1.12 for two strains, 1.03 for the other three strains. In conclusion, punicalagin showed antimicrobial activity on colistin-resistant *A. baumannii* strains. It was determined that the combination with colistin had an indifferent effect on all tested strains. No synergistic effects were observed on any of the strains. In addition, no antagonistic effects were detected.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, colistin, punicalagin, indifferent effect

Sorumlu Yazar: elifkose@akdeniz.edu.tr, elifkose@gmail.com

<http://dergipark.gov.tr/ejosat>

1. Giriş

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) Gram negatif, aerobik, hareketsiz ve non-fermentatif bir bakteridir (Howard ve ark., 2012). *A. baumannii*, hastane enfeksiyonlarında en sık karşılaşılan bakterilerden biri olup, üriner sistem enfeksiyonları, bakteriyemi, pnömoni ve yara enfeksiyonları gibi ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır (Li ve ark., 2020). Antibiyotiklere karşı yüksek oranda direnç geliştirme yeteneğine sahip olan bu bakteri tedavisinde kullanılan birçok antibiyotige karşı dirençlidir. *Acinetobacter* enfeksiyonları 1970'lerin başına kadar geniş spektrumlu β -laktamlar, sefalosporinler ve tetrasiklinler gibi çoğu geleneksel antibiyotik ile tedavi edilebilirken, kolistin dahil olmak üzere birçok antimikrobiyal ajan bu bakterilere karşı artık etkinliğini kaybetmiştir (Asif ve ark., 2018). Kolistin, ilaca dirençli Gram-negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde hem monoterapide hem de kombinasyon tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir polimiksin antibiyotik ajanıdır. Ne yazık ki tüm dünyada kolistine dirençli *A. baumannii* suşları her geçen yıl bildirilmektedir. (Rodjun ve ark., 2020). Bu yüzden, *A. baumannii* Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği tarafından insan sağlığını ciddi şekilde tehdit eden ve tedavisinde yeni antibiyotiklere acilen ihtiyaç duyulan altı dirençli patojenden biri olarak tanımlanmıştır (Qureshi ve ark., 2015; Ayoub Moubareck ve Hammoudi Hatat, 2020).

Günümüzde dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların üstesinden gelmek için antibiyotiklere alternatif olabilecek yeni antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesi amaçlı birçok çalışma yapılmaktadır. Geçmişten günümüze bitkiler pek çok ülkede, birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Nar (*Punica granatum* L.) Punicaceae ailesinden çalı veya küçük ağaç formunda olan çok yıllık bir bitkidir (Trabelsi ve ark., 2020). Doğal olarak İran'a özgü olan nar, oradan Türkiye dahil Asya, Kuzey Afrika ve Güney Avrupa'ya yayılmıştır. (Duman ve ark., 2009). Yenilebilir en eski meyvelerden biri olan narın meyveleri, kabukları ve kökleri birçok ülkede yerel şifacılar tarafından bitkisel ilaçlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Al-Zoreky, 2009). Narın, Ayurvedik ve Unani sistemlerinde inflamatuvar hastalıkları ve sindirim sistemi bozukluklarını tedavi etmek için kullanıldığına dair kayıtlar bulunmaktadır. Eski Mısırlılar narı tenyaların ve diğer parazitlerin tedavisinde kullanmışlardır (Celiksoy ve Heard, 2021). Narın meyveleri asidoz, dizanteri, mikrobiyal enfeksiyonlar, ishal, helmintiyazis, kanama ve solunum yolu patolojilerini tedavi etmek için kullanılmıştır. (Duman ve ark., 2009). Daha yakın zamanlarda, nar, cilt enfeksiyonları, diş hekimliği, gıda koruma vb. gibi çeşitli alanlarda antimikrobiyal potansiyeli nedeniyle kapsamlı ve bilimsel olarak incelenmiştir (Celiksoy ve Heard, 2021).

Nar kabuğu, punikalagin, punikalalin, gallagik asit, ellagik asit ve ellagik asit glikozitleri gibi ellagitaninler açısından zengindir. Punikalagin (2,3-heksahidroksi-difenoil-4,6-gallagilglikoz) yüksek moleküler ağırlıklı, suda çözünür en önemli ellagitanin bileşiklerinden birisidir (Aqil ve ark., 2012). Nar kabuğundaki doğal biyoaktif bileşik olarak nitelendirilen punikalagin antioksidan (Seeram ve ark., 2005; Aqil ve ark., 2012), antimikrobiyal (Xu ve ark., 2017; Gosset-Erard ve ark., 2021), antikanser (Ganesan ve ark., 2020; Berdowska ve ark., 2021), antiviral (Houston ve ark., 2017; Du ve ark., 2021) aktivite gibi birçok özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir.

Bu bilgilerden yola çıkarak bu çalışmanın amacı kolistin dirençli *A. baumannii* suşlarına karşı punikalagin tek başına antimikrobiyal ve kolistin ile kombinasyon aktivitesinin değerlendirilmesidir. Literatür bilgilerine göre dirençli *A. baumannii* suşlarına karşı punikalagin kombinasyon etkisi daha önce araştırılmamıştır. Böylelikle bu çalışma ile elde edilen sonuçların punikalagin ile yapılacak ileriki araştırmalar için yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bakteri Suşları ve Antimikrobiyal Ajanlar

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji bölümünde klinik örneklerden izole edilmiş kolistine dirençli *A. baumannii* suşları arasından rastgele seçilen beş adet suş çalışmaya alınmıştır. Suşlar çalışma öncesinde derin dondurucudan çıkarılarak Kanlı agar besiyerine (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) art arda iki kez pasajlanıp, normal atmosferde, $35\pm 2^\circ\text{C}$ 'de bir gece inkübe edilmiştir. Üreyen kolonilerden daha sonra taze kültür pasajları yapılarak saf olarak elde edilen bakteri kolonileri testlerde kullanılmıştır.

Kolistin antibiyotiginin stok çözeltisi için, Kolistin Sülfat (C4461, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kullanılmış, distile suda çözülerek stok çözeltisi porsiyonlanarak -80°C 'de saklanmıştır. Punikalagin (C6201-P063, TransMIT, Giessen, Germany) besiyerinde çözülerek stok solüsyon testin uygulanacağı zaman günlük olarak hazırlanmıştır.

2.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Punikalagin ve kolistin antimikrobiyal aktivitelerini saptamak için CLSI (Clinical Laboratory Standarts Institute) tarafından önerilen sıvı mikrodilüsyon testi yapılarak Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir (CLSI, 2018). Test 96 kuyucuklu steril mikrodilüsyon plaklarında yapılmış olup besiyeri olarak katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (MHB, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) kullanılmıştır. İlk olarak, her bir kuyucuğa 50 μl besiyeri eklenmiştir. Test edilecek antimikrobiyallerin başlangıç konsantrasyonları hazırlanarak (kolistin için 512 $\mu\text{g/ml}$, punikalagin için 1024 $\mu\text{g/ml}$) ilk kuyucuklara 50 μl konulup seri dilüsyonları yapılmıştır. Tüm bakterilerin steril %0.9 NaCl solüsyonunda 0.5 McFarland (1×10^8 hücre/ml) standart yoğunluğuna göre süspansiyonları hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonundan 50 μl alınarak tüm kuyucuklara eklenmiştir. Her bir bakteri için bakteri üreme kontrolü (MHB+bakteri) ve her mikrodilüsyon plağı için besiyeri sterilite kontrolü (MHB) çalışılmıştır. Ayrıca *Escherichia coli* NCTC 13846 suşu kolistin dirençliliğini doğrulamak için kalite kontrol suşu olarak kullanılmıştır. Mikrodilüsyon plakları $35\pm 2^\circ\text{C}$ 'de 16-20 saat süre ile aerop koşullarda etüvde inkübe edilmiştir. Antibiyotik içeren kuyucuklardaki üreme yoğunluğu her test setinde kullanılan kontrol kuyucuklarındaki (antibiyotiksiz) üreme yoğunluğu ile kıyaslanarak MİK değerleri belirlenmiştir. MİK, bakterilerin mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen inhibe eden ve çıplak gözle belirlenebilen en düşük antimikrobik ilaç konsantrasyonudur. Her bir deney üç kere tekrar edilmiştir.

2.3. Dama Tahtası (Checkerboard) Sinerji Testi

Bakteri suşları üzerinde punikalagin ile kolistin kombinasyonunun etkisini test etmek için dama tahtası (checkerboard) yöntemi uygulanmıştır (Moody, 2007). Bu test, mikrodilüsyon esasına dayanan sinerji testlerinden biridir. Her iki antimikrobiyal ajanın kombinasyon aktivitesi, her bir bakteri suşu için 96 kuyucuklu plak üzerinde test edilmiştir ve besiyeri olarak katyon ayarlı MHB kullanılmıştır. MİK değerlerinin dört kat üstü dilüsyon (4xMİK) ve beş kat altı dilüsyon (1/32xMİK) kullanılarak iki farklı ajan kombinasyonunun etkinliği test edilmiştir. İlk olarak katyon ayarlı MHB içeren tüplerde her bir ajanın belirlenen konsantrasyonlarından geometrik dilüsyonları hazırlanmıştır. Kolistin hazırlanan çözeltileri plak dikey düzleminde yukarıdan aşağıya doğru konulurken, punikalagin çözeltileri ise yatay düzlemde sağdan sola doğru konulmuştur.

Böylelikle her bir kuyucukta iki ajanın farklı konsantrasyondaki çözeltilerini içeren kombinasyonları elde edilmiştir. Buna göre tüplerde geometrik dilüsyonları hazırlanan her bir ajandan 50 µl, toplamda bir kuyucukta 100 µl madde konsantrasyonu elde edilmiştir. Bakteri inokulumu 0.5 McFarland (1x10⁸ hücre/ml) standart yoğunluğuna göre steril %0.9 NaCl solüsyonunda hazırlanmıştır ve kuyucuklardaki en son bakteri konsantrasyonu 5x10⁵ hücre/ml olacak şekilde her bir kuyucuğa 10 µl eklenmiştir. Plak üzerinde antimikrobiyal ajan içermeyen üreme kontrol kuyucuğu ve bakteri içermeyen sterilite kontrol kuyucuğu da hazırlanmıştır. Ayrıca her iki ilacın MİK değerleri aynı plak üzerinde dama tahtası testi ile eş zamanlı olarak tekrar çalışılmıştır. Mikrodilüsyon plakları 35±2°C'de 16-20 saat süre ile aerop koşullarda etüve inkübe edilmiştir. Her bir deney üç kere tekrar edilmiştir. Dama tahtası testi uygulaması sonucu elde edilen 96 kuyucuklu plağın temsili görünümü Şekil 1'de verilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*	11**	12
Punikalagin	A	4×Kol +	4×Kol +	4×Kol +	4×Kol +	4×Kol +	4×Kol +	4×Kol +		4×Kol	4×Png	
		1/32×Png	1/16×Png	1/8×Png	1/4×Png	1/2×Png	1×Png	2×Png	4×Png			
	B	2×Kol +	2×Kol +	2×Kol +	2×Kol +	2×Kol +	2×Kol +	2×Kol +		2×Kol	2×Png	
		1/32×Png	1/16×Png	1/8×Png	1/4×Png	1/2×Png	1×Png	2×Png	4×Png			
	C	1×Kol +	1×Kol +	1×Kol +	1×Kol +	1×Kol +	1×Kol +	1×Kol +		1×Kol	1×Png	
		1/32×Png	1/16×Png	1/8×Png	1/4×Png	1/2×Png	1×Png	2×Png	4×Png			
	D	1/2×Kol +	1/2×Kol +	1/2×Kol +	1/2×Kol +	1/2×Kol +	1/2×Kol +	1/2×Kol +		1/2×Kol	1/2×Png	
		1/32×Png	1/16×Png	1/8×Png	1/4×Png	1/2×Png	1×Png	2×Png	4×Png			
E	1/4×Kol +	1/4×Kol +	1/4×Kol +	1/4×Kol +	1/4×Kol +	1/4×Kol +	1/4×Kol +		1/4×Kol	1/4×Png		
	1/32×Png	1/16×Png	1/8×Png	1/4×Png	1/2×Png	1×Png	2×Png	4×Png				
F	1/8×Kol +	1/8×Kol +	1/8×Kol +	1/8×Kol +	1/8×Kol +	1/8×Kol +	1/8×Kol +		1/8×Kol	1/8×Png		
	1/32×Png	1/16×Png	1/8×Png	1/4×Png	1/2×Png	1×Png	2×Png	4×Png				
G	1/16×Kol +	1/16×Kol +	1/16×Kol +	1/16×Kol +	1/16×Kol +	1/16×Kol +	1/16×Kol +		1/16×Kol	1/16×Png	Üreme Kontrol	
	1/32×Png	1/16×Png	1/8×Png	1/4×Png	1/2×Png	1×Png	2×Png	4×Png				
H	1/32×Kol +	1/32×Kol +	1/32×Kol +	1/32×Kol +	1/32×Kol +	1/32×Kol +	1/32×Kol +		1/32×Kol	1/32×Png	Sterilite Kontrol	
	1/32×Png	1/16×Png	1/8×Png	1/4×Png	1/2×Png	1×Png	2×Png	4×Png				

Şekil 1. Dama tahtası sinerji testinin temsili uygulama şekli. Kol: Kolistin, Png: Punikalagin, *: Eş zamanlı çalışılan kolistin MİK, **: Eş zamanlı çalışılan punikalagin MİK

Sonuçların yorumlanması için önce her iki antibiyotik ayrı ayrı Fraksiyonel İnhibisyon Konsantrasyonu (FİK) hesaplanmıştır. Sonra da FİK indeksi (FİKİ) bulunmuştur.

$FİK_a = a$ maddesinin kombinasyondaki MİK değeri/a maddesinin tek başına MİK değeri

$FİK_b = b$ maddesinin kombinasyondaki MİK değeri/b maddesinin tek başına MİK değeri

$FİKİ = FİK_a + FİK_b$

Buna göre çıkan değer; $FİKİ \leq 0.5$ ise sinerjistik etki, $0.5 < FİKİ \leq 4$ ise indiferan etki, $FİKİ > 4$ ise antagonistik etki olarak yorumlanmıştır.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

3.1. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi

Punikalagin ve kolistin *A. baumannii* suşları üzerine antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi için sıvı mikrodilüsyon testi uygulanarak MİK değerleri saptanmıştır. Buna göre e-ISSN: 2148-2683

punikalagin tüm suşlara karşı 256 µg/ml MİK değeri ile antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Kolistin MİK değerleri ise iki suşta 32 µg/ml, diğer üç suşta 8 µg/ml olarak tespit edilmiştir. *E. coli* NCTC 13846 için kolistin MİK değeri 4 µg/ml olarak saptanmıştır. CLSI tarafından kolistin için belirlenen MİK değerlerine göre ≤ 1 µg/ml duyarlı, ≥ 4 µg/ml dirençli olarak kabul edilmektedir. Bu kriterlere göre beş *A. baumannii* suşunun da kolistine dirençli olduğu doğrulanmıştır. Uygulanan mikrodilüsyon testi sonuçlarına göre *A. baumannii* suşları üzerinde elde edilen MİK değerleri Tablo 1'de verilmiştir.

Literatürde punikalagin *A. baumannii* üzerine etkisinin araştırıldığı bir adet çalışma bulunmuştur. Bu çalışmada bizim bulgularımızdan farklı olarak *A. baumannii*'ye karşı punikalagin herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediğini saptamışlardır (Álvarez-Martínez ve ark., 2021). Punikalagin nar ekstresi içinde antimikrobiyal özelliğe sahip asıl bileşik olduğunu ve birçok mikroorganizma türüne karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini ortaya koyan birçok araştırma mevcuttur. Xu ve ark. (2017), 0.25 mg/ml MİK değeri ile punikalagin *Staphylococcus aureus*'a karşı iyi aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Gosset-Erard ve ark. (2021) yaptıkları çalışmalarında, punikalagini nar kabuğu ekstraktındaki antibakteriyel özellikteki bileşik olarak tanımlamışlardır. Punikalagin hem α hem de β anomerik formlarının, çeşitli gram

pozitif ve gram negatif bakteriler ile bir maya türü olan *Candida albicans*'a karşı 0.3-1.2 µg/ml aralığındaki MİK değerleri ile aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarına karşı punikalaginın etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise 20 mm inhibisyon zonu ve 61.5 µg/ml MİK değeri ile test edilen tüm suşlara karşı punikalaginın antibakteriyel aktivite gösterdiği saptanmıştır (Machado ve ark., 2002). Li ve ark. (2014), 10 *Salmonella* suşuna karşı punikalaginın 250-1000 µg/ml aralığında MİK değerleri ile antimikrobiyal etki gösterdiğini bulmuşlardır.

3.2. Dama Tahtası (Checkerboard) Sinerji Testinin sonuçları

Tablo 1. Tüm suşlara karşı punikalagin ve kolistin antimikrobiyal ve kombinasyon aktivitelerinin sonuçları

Bakteri suşları	Png			Kol			Png+Kol	
	MİK _T	MİK _K	FİK _{Png}	MİK _T	MİK _K	FİK _{Kol}	FİKİ	Sonuç
<i>A. baumannii</i> 1	256	256	1	8	0.25	0.03	1.03	İndiferan
<i>A. baumannii</i> 2	256	256	1	8	0.25	0.03	1.03	İndiferan
<i>A. baumannii</i> 3	256	256	1	32	4	0.12	1.12	İndiferan
<i>A. baumannii</i> 4	256	256	1	32	4	0.12	1.12	İndiferan
<i>A. baumannii</i> 5	256	256	1	8	0.25	0.03	1.03	İndiferan

Png: Punikalagin, Kol: Kolistin, MİK_T: Tek başına MİK (µg/ml), MİK_K: Kombinasyonda iken MİK (µg/ml)

Literatürde punikalaginın *A. baumannii*'ye karşı kombinasyon aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmıştır. Farklı mikroorganizmalar üzerinde kombinasyon aktivite araştırmaları da sınırlıdır. Mun ve ark. (2018), MRSA üzerine punikalagin ve oksasilin kombinasyonunun etkisini araştırdıkları çalışmalarında test ettikleri tüm suşlar üzerinde sinerjistik etki tespit etmişlerdir. da Silva ve ark. (2020) punikalagin ile nistatin kombinasyonunun iki *Candida* suşu üzerinde antifungal etkinliği arttırdığını tespit etmişlerdir. *Candida* türleri ile ilgili yapılan diğer bir çalışmada, punikalagin ve flukonazolün *C. albicans* ve *C. parapsilosis* üzerinde sinerjistik etki gösterdiği saptanmıştır (Endo ve ark., 2010).

4. Sonuç

Sonuç olarak, bu çalışmada kolistin dirençli *A. baumannii* suşları üzerine punikalaginın antimikrobiyal ve kolistin ile kombinasyon aktivitesi değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre punikalagin *A. baumannii* suşları üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Dirençli suşlar üzerinde punikalaginın tek başına gösterdiği bu etkinin değerli olduğu düşünülmektedir.

Punikalaginın kolistin ile kombinasyon aktivitesinin değerlendirilmesi sonucunda test edilen suşlar üzerine kombinasyonun indiferan etkili olduğu tespit edilmiştir. Tedavi amaçlı kullanılan iki antimikrobiyal ajanın sinerjistik etkili olması tedavide başarıyı arttıran bir etkileşimdir. Kombinasyon tedavileri günümüzde dirençli bakterilerin tedavisinde çoğunlukla uygulanmaktadır. Dirençli bakterilere çözüm arayışları içinde doğal bileşikler ile antibiyotiklerin kombin edilerek aktivitelerinin artırılmasına dayalı araştırmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda antibiyotikler ile sinerjistik etkileşimli bir doğal bileşik alternatif bir ajan olarak görülmektedir. Bu çalışmada ise punikalagin ile kolistin kombinasyonu beklenen sinerjistik etkileşimi gösterememiştir. Bununla birlikte punikalaginın bu suşlar üzerinde bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gözönünde bulundurulduğunda dirençli *A. baumannii*

Beş *A. baumannii* suşu üzerine punikalagin ile kolistin kombinasyonunun etkisi dama tahtası (checkerboard) sinerji testi ile değerlendirilmiştir. Test sonucunda punikalagin ve kolistin kombinasyonu için hesaplanan FİKİ değerlerine göre iki suş için 1.12, diğer üç suş için ise 1.03 FİKİ değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlar yorumlandığında tüm suşlar üzerinde iki ajanın kombinasyonunun indiferan etkili olduğu tespit edilmiştir. Hiçbir suşa karşı kombinasyon sinerjistik etkileşim gösterememiştir. Bunun yanısıra herhangi bir antagonistik etki de saptanmamıştır. Sinerji testinin sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.

infeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan farklı gruptaki antibiyotikler ile kombine edilerek araştırılması önerilmektedir.

Kaynakça

- Álvarez-Martínez, F. J., Rodríguez, J. C., Borrás-Rocher, F., Barrajón-Catalán, E., & Micol, V. (2021). The antimicrobial capacity of *Cistus salviifolius* and *Punica granatum* plant extracts against clinical pathogens is related to their polyphenolic composition. *Scientific reports*, 11(1), 1-12.
- Al-Zoreky, N. S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International journal of food microbiology*, 134(3), 244-248.
- Aqil, F., Munagala, R., Vadhanam, M. V., Kausar, H., Jeyabalan, J., Schultz, D. J., & Gupta, R. C. (2012). Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. *Food Research International*, 49(1), 345-353.
- Asif, M., Alvi, I. A., & Rehman, S. U. (2018). Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infection and drug resistance*, 11, 1249.
- Ayoub Moubareck, C., & Hammoudi Halat, D. (2020). Insights into *Acinetobacter baumannii*: a review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics*, 9(3), 119.
- Berdowska, I., Matusiewicz, M., & Fecka, I. (2021). Punicalagin in Cancer Prevention—Via Signaling Pathways Targeting. *Nutrients*, 13(8), 2733.
- Celiksoy, V., & Heard, C. M. (2021). Antimicrobial Potential of Pomegranate Extracts. In *Pomegranate*. IntechOpen.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility

- Testing. 28th ed. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- da Silva, R. A., Ishikiriama, B. L. C., Ribeiro Lopes, M. M., de Castro, R. D., Garcia, C. R., Porto, V. C., ... & Lara, V. S. (2020). Antifungal activity of Punicalagin–nystatin combinations against *Candida albicans*. *Oral Diseases*, 26(8), 1810-1819.
- Du, R., Cooper, L., Chen, Z., Lee, H., Rong, L., & Cui, Q. (2021). Discovery of chebulagic acid and punicalagin as novel allosteric inhibitors of SARS-CoV-2 3CLpro. *Antiviral research*, 190, 105075.
- Duman, A. D., Ozgen, M., Dayisoğlu, K. S., Erbil, N., & Durgac, C. (2009). Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum L.*) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. *Molecules*, 14(5), 1808-1817.
- Endo, E. H., Cortez, D. A. G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2010). Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Research in Microbiology*, 161(7), 534-540.
- Ganesan, T., Sinniah, A., Chik, Z., & Alshawsh, M. A. (2020). Punicalagin regulates apoptosis-autophagy switch via modulation of annexin A1 in colorectal cancer. *Nutrients*, 12(8), 2430.
- Gosset-Erard, C., Zhao, M., Lordel-Madeleine, S., & Ennahar, S. (2021). Identification of punicalagin as the bioactive compound behind the antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) peels. *Food Chemistry*, 352, 129396.
- Houston, D. M., Bugert, J. J., Denyer, S. P., & Heard, C. M. (2017). Potentiated virucidal activity of pomegranate rind extract (PRE) and punicalagin against Herpes simplex virus (HSV) when co-administered with zinc (II) ions, and antiviral activity of PRE against HSV and aciclovir-resistant HSV. *PloS one*, 12(6), e0179291.
- Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., & Sleator, R. D. (2012). *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, 3(3), 243-250.
- Li, G., Yan, C., Xu, Y., Feng, Y., Wu, Q., Lv, X., ... & Xia, X. (2014). Punicalagin inhibits *Salmonella* virulence factors and has anti-quorum-sensing potential. *Applied and environmental microbiology*, 80(19), 6204-6211.
- Li, J., Fu, Y., Zhang, J., Zhao, Y., Fan, X., Yu, L., ... & Li, C. (2020). The efficacy of colistin monotherapy versus combination therapy with other antimicrobials against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 isolates. *Journal of Chemotherapy*, 32(7), 359-367.
- Machado, T. D. B., Leal, I. C., Amaral, A. C. F., Santos, K., Silva, M. G. D., & Kuster, R. M. (2002). Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 13(5), 606-610.
- Moody J. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: Isenberg HD (Ed.) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, 2007: p.5.12.1-5.12.23.
- Mun, S. H., Kang, O. H., Kong, R., Zhou, T., Kim, S. A., Shin, D. W., & Kwon, D. Y. (2018). Punicalagin suppresses methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *Journal of pharmacological sciences*, 137(4), 317-323.
- Qureshi, Z. A., Hittle, L. E., O'Hara, J. A., Rivera, J. I., Syed, A., Shields, R. K., ... & Doi, Y. (2015). Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. *Clinical infectious diseases*, 60(9), 1295-1303.
- Rodjun, V., Houngsaitong, J., Montakantikul, P., Paiboonvong, T., Khuntayaporn, P., Yanyongchaikit, P., & Sriyant, P. (2020). In Vitro Activities of Colistin and Sifaxacin Combinations against Multidrug-, Carbapenem-, and Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii* Using the Broth Microdilution Checkerboard and Time-Kill Methods. *Antibiotics*, 9(8), 516.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Henning, S. M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M. G., & Heber, D. (2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(6), 360-367.
- Trabelsi, A., El Kaibi, M. A., Abbassi, A., Horchani, A., Chekir-Ghedira, L., & Ghedira, K. (2020). Phytochemical study and antibacterial and antibiotic modulation activity of *Punica granatum* (Pomegranate) leaves. *Scientifica*, 2020.
- Xu, Y., Shi, C., Wu, Q., Zheng, Z., Liu, P., Li, G., ... & Xia, X. (2017). Antimicrobial activity of punicalagin against *Staphylococcus aureus* and its effect on biofilm formation. *Foodborne pathogens and disease*, 14(5), 282-287.