

Farnesolün *Candida* Biyofilmleri Üzerine Etkilerinin Mikrobiyolojik, Elektron
Mikroskopik ve Kolorimetrik Yöntemlerle Araştırılması

Mihrinur Yapıcı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Kasım 2019

The Investigation of Effects of Farnesol on *Candida* Biofilms by Microbiological, Electron
Microscopic and Colorimetric Methods

Mihrinur Yapıcı

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biotechnology and Biosafety

November 2019

Farnesolün *Candida* Biyofilmleri Üzerine Etkilerinin Mikrobiyolojik, Elektron
Mikroskopik ve Kolorimetrik Yöntemlerle Araştırılması

Mihrinur Yapıcı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. İlknur Dağ

Kasım 2019

ONAY

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Mihrinur Yapıcı'nın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Farnesolün *Candida* Biyofilmleri ve Bazı Hücre Yüzey Proteinleri Üzerine Etkilerinin Mikrobiyolojik, Elektron Mikroskopik ve Kolorimetrik Yöntemlerle Araştırılması" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. İlknur Dağ

İkinci Danışman : Öğr. Gör. Dr. Bükay Yenice Gürsu

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Prof. Dr. İlknur Dağ

Üye : Prof. Dr. Mustafa Yamaç

Üye : Prof. Dr. Semra İlhan

Üye : Prof. Dr. Miriş Dikmen

Üye : Prof. Dr. Hakan Şentürk

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Prof. Dr. İlknur Dağ ve Öğr. Gör. Dr. Bükay Yenice Gürsu danışmanlığında hazırlamış olduğum “Farnesolün *Candida* Biyofilmleri Üzerine Etkilerinin Mikrobiyolojik, Elektron Mikroskopik ve Kolorimetrik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu, tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.

25/11/2019

Mihrinur Yapıcı

ÖZET

Candida türleri önemli mukozal ve yayılcı infeksiyonlara yol açabilen fırsatçı mantarlardır. Son yıllarda bu infeksiyonların insidansında görülen artış ve yüksek mortalite oranları, daha etkili antifungal tedavi stratejilerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. En yaygın izole edilen tür *C. albicans* olmakla beraber, non-albicans türlerin yol açtığı infeksiyonlar da sıklıkla rapor edilmektedir. *Candida* türleri morfolojik değişim ya da biyofilm oluşumu gibi fenotipik adaptasyonları sağlayan Quorum Sensing (QS) molekülleri salgırlar. Bu sistemde, mikroorganizmalar ürettikleri sinyal molekülleri sayesinde birbirleri ile haberleşebilmekte ve belirli bir yoğunluğa ulaştıklarında virülans faktörlerine ait çeşitli genlerin ekspresyonlarını tetikleyebilmektedirler. *Candida* türlerindeki çoğunluk algılama sistemi hakkında bilgiler oldukça azdır ve farnesol ökaryotlarda keşfedilen ilk QS sinyal molekülüdür. İlginç bir şekilde farnesol, *Candida* türleri ile hem bir QS molekülü olarak ve hem de ekzojen bir ajan olarak etkileşime girebilir. Farnesolün bu duyarlılığında hücrenin gelişim süresi, boyutları, sıcaklığı ya da gelişim ortamı gibi faktörler etkili olmaktadır. Çalışmamızda farnesolün hem planktonik ve hem de biyofilm formundaki *Candida* türleri üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmaya *C. albicans*'ın yanısıra (1 standart ve 1 klinik izolat), 5 farklı klinik *Candida* izolatı dahil edilmiştir. Etken maddenin planktonik *Candida* türleri üzerine etkisi broth mikrodilüsyon (MİK) ve geçirimli elektron mikroskop (TEM) ile; biyofilm üzerine olan etkileri de kolorimetrik (XTT) ve taramalı elektron mikroskop (SEM) ile araştırılmıştır. Sonuçlarımız, farnesolün *Candida* türlerinin planktonik ve biyofilm formları üzerine yaklaşık 37,5 µM - 600 µM konsantrasyon aralıklarındaki inhibe edici etkisini ortaya koymuştur. Farnesol daha düşük konsantrasyonlarda ise biyofilm artırıcı bir etki sergilemiştir. TEM verilerimiz; 37,5 µM konsantrasyonda farnesol muamelesi sonucu hücrelerde membran ve duvar hasarları, vakuolizasyon ya da granülasyonlar göstermiştir. SEM verilerinde ise farnesol muamelesi sonucu pre ve post biyofilm uygulamalarında kontrol grubuna kıyasla biyofilm indirgenmesi tespit edilmiştir. Farnesol antifungal ve antibiyofilm tedavi stratejilerinde etkili olarak kullanılabilir. Ancak verilerimizin daha detaylı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Farnesol, Biyofilm, *Candida*, Quorum Sensing, Elektron mikroskopi, XTT, Biyomateryal

SUMMARY

Candida species are opportunistic fungi that can cause significant mucosal and invasive infections. The increase in the incidence of these infections in recent years and the high mortality rates suggest the necessity of more effective antifungal treatment strategies. Although the most common isolated species is *C. albicans*, infections caused by non-*albicans* species are also frequently reported. *Candida* species secrete Quorum sensing (QS) molecules that provide phenotypic adaptations such as morphological change or biofilm formation. In this system, microorganisms can communicate with each other through the signal molecules they produce and, when they reach a certain concentration, they can trigger the expression of various genes of virulence factors. Information about the Quorum Sensing system in *Candida* species is scarce and farnesol is the first QS signal molecule discovered in eukaryotes. Interestingly, farnesol can interact with *Candida* species both as a QS molecule and as an exogenous agent. Growth time and size of the cell, temperature or growth environment are effective in this sensitivity of farnesol. The aim of this study was to investigate the effects of farnesol on both the planktonic and biofilm forms of *Candida* species. In addition to *C. albicans* (1 standard and 1 clinical isolate), 5 different clinical isolates were included to the study. The effect of the active substance on planktonic *Candida* was investigated by broth microdilution (MIC) and transmission electron microscope (TEM); the effects on biofilm were also investigated by colorimetric (XTT) and scanning electron microscope (SEM). Our results demonstrated the inhibitory effect of farnesol on the planktonic and biofilm forms of *Candida* at concentrations ranging from about 37.5 μM to 600 μM . Farnesol showed a biofilm-enhancing effect at lower concentrations. Our TEM data showed the membrane and wall damage, vacuolization or granulation in cells as a result of farnesol treatment at a concentration of 37.5 μM . In SEM data, biofilm reduction was found in pre and post biofilm applications compared to control group as a result of farnesol treatment. Farnesol can be used effectively in antifungal and antibiotic treatment strategies, but our data needs to be supported by more detailed studies.

Key words: Farnesol, Biofilm, *Candida*, Quorum sensing, Electron microscopy, XTT, Biomaterial

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana katkıda bulunan, sabır, anlayış ve güler yüzleriyle değerli zamanlarını benim için ayıran ve beni yönlendiren kıymetli danışman hocalarım Prof. Dr. İlknur DAĞ ve Öğr. Gör. Dr. Bükay Yenice GÜRSU' ya,

Laboratuvar çalışmalarım ve tezim esnasında değerli bilgi ve tecrübeleriyle benden yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocalarım Öğr. Gör. Dr. Betül Yılmaz ÖZTÜRK ve Öğr. Gör. Tayfun ŞENGEL'e,

Beni hiç yalnız bırakmayan sevgili dostlarıma,

Tüm eğitim hayatımda her türlü desteğiyle yanımda olan canım aileme,

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1.Mantarlar	5
2.1.1. <i>Candida</i> cinsi mantarlar	6
2.1.2. <i>Candida</i> türlerinin sınıflandırılması	7
2.1.3. <i>Candida</i> türlerinin morfolojik özellikleri ve boyanma durumları	7
2.1.4. <i>Candida</i> türlerinin identifikasyonları	8
2.1.5. <i>Candida</i> türlerinin hücre yapısı	9
2.1.6.Tıbbi açıdan önemli <i>Candida</i> türleri	10
2.1.6.1. <i>Candida albicans</i>	10
2.1.6.2. <i>Candida glabrata</i>	10
2.1.6.3. <i>Candida tropicalis</i>	11
2.1.6.4. <i>Candida parapsilosis</i>	11
2.1.6.5. <i>Candida krusei</i>	11
2.1.6.6. <i>Candida kefyr</i>	12
2.1.7.Epidemiyoloji	12

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.1.8.Patojenite ve virülans faktörleri	13
2.2. <i>Candida</i> Türlerinde Antifungal Tedavi	15
2.3. <i>Candida</i> İnfeksiyonları	18
2.4. <i>Candida</i> Türlerinde Antifungal Direnç.....	19
2.5.Biyofilm	20
2.5.1.Tanımı ve yapısı	20
2.5.2.Biyofilm oluşum basamakları	21
2.5.3.Biyofilm direnç mekanizmaları.....	22
2.5.3.1. <u>Antimikrobiyalın biyofilme penetrasyonunun engellenmesi</u>	22
2.5.3.2. <u>Yavaş üreme ve stres cevabı</u>	22
2.5.3.3. <u>Heterojenite</u>	23
2.5.3.4. <u>Israrcılık (persestence) fenomeni</u>	23
2.5.3.5. <u>Genetik adaptasyon</u>	23
2.5.3.6. <u>Metabolik aktivite</u>	23
2.5.3.7. <u>Atım Pompaları</u>	23
2.6.Quorum Sensing Sistemi ve Farnesol	24
2.6.1.Quorum sensing sistemi	24
2.6.2.Farnesol	26
2.7.Biyofilm Oluşumunun Kontrolü ve Engellenmesi	28
3.MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1.Materyal	30
3.1.1.Çalışmada kullanılan organizmalar	30
3.1.2.Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar.....	30

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.3.Elektron mikroskopik incelemelerde kullanılan kimyasallar.....	31
3.2.Yöntem.....	32
3.2.1.Farnesol muamelesi ile <i>Candida</i> türlerinde <i>in vitro</i> üreme takibi	32
3.2.2.Biyofilm oluşumu üzerine farnesolün etkisinin XTT indirgeme testi ile tayini	33
3.2.3.Oluşmuş biyofilm üzerine farnesolün etkisinin XTT indirgeme testi ile tayini	34
3.2.4.Farnesolün planktonik <i>Candida</i> hücreleri üzerine etkisinin geçirimli elektron mikroskopi (TEM) ile incelenmesi.....	34
3.2.5.Farklı biyomateryaller üzerinde farnesolün <i>Candida</i> biyofilmine etkilerinin SEM ile incelenmesi	35
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1.Bulgular	37
4.1.1.Farnesol muamelesi ile <i>Candida</i> türlerinde <i>in vitro</i> üreme takibine dayalı sonuçlar	37
4.1.2.Farnesolün <i>Candida</i> biyofilm oluşumu üzerine etkisinin XTT indirgeme testine dayalı sonuçları	42
4.1.3.Farnesolün oluşmuş <i>Candida</i> biyofilmi üzerine etkisinin XTT indirgeme testi ile tayinine dayalı sonuçları	46
4.1.4.Farnesolün planktonik <i>Candida</i> hücreleri üzerine etkisinin geçirimli elektron mikroskopi (TEM) görüntüleme sonuçlarına göre değerlendirilmesi	53
4.1.5.Farklı biyomateryaller üzerinde farnesolün <i>Candida</i> biyofilmine etkilerinin SEM ile değerlendirilmesi.....	54
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Çeşitli antifungal ajanların etki şekilleri ve birincil hedefleri (Spampinato ve Leonardi, 2013)	16
2.2. Mantarlarda Quorum Sensing (Sharma ve Jangid, 2017).....	25
2.3. Farnesil Difosfatın (FPP) Enzimatik Defosforilasyonu (Nickerson vd., 2006)	26
4.1. Araştırmada kullanılan çalışma basamakları.....	37
4.2. <i>C. albicans</i> ATCC 14053 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal üreme değerleri (Grafikte gösterilen 10 veri için Standart Sapma (SD):0,28) 38	38
4.3. <i>C. albicans</i> 1766 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal üreme değerleri (Grafikte gösterilen 10 veri için SD:0,27).....	38
4.4. <i>C. tropicalis</i> 1678 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal üreme değerleri (SD:0,05).....	39
4.5. <i>C. krusei</i> 1561 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal üreme değerleri (SD: 0,36).....	39
4.6. <i>C. parapsilosis</i> 1799 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal üreme değerleri (SD: 0,24).....	40
4.7. <i>C. kefyr</i> 1798 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal üreme değerleri (SD: 0,33).....	40
4.8. <i>C. glabrata</i> 1744 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal üreme değerleri (SD: 0,16).....	41
4.9. <i>C. albicans</i> ATCC 14053 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (Grafikte gösterilen 10 veri için SD: 0,19)	43
4.10. <i>C. albicans</i> 1766 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,22).....	43
4.11. <i>C. tropicalis</i> 1678 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,1).....	44

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.12. <i>C. krusei</i> 1561 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,42).....	44
4.13. <i>C. parapsilosis</i> 1799 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,31)	45
4.14. <i>C. kefyr</i> 1798 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,29).....	45
4.15. <i>C. glabrata</i> 1744 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,22).....	46
4.16. <i>C. albicans</i> ATCC 14053 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (Grafikte gösterilen 5 veri için SD: 0,15).....	47
4.17. <i>C. albicans</i> 1766 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,22).....	47
4.18. <i>C. tropicalis</i> 1678 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,29).....	48
4.19. <i>C. krusei</i> 1561 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,41).....	48
4.20. <i>C. parapsilosis</i> 1799 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,14)	49
4.21. <i>C. kefyr</i> 1798 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,04).....	49
4.22. <i>C. glabrata</i> 1744 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,27).....	50
4.23. Kontrol grubu ve farnesol uygulanan planktonik <i>C. albicans</i> ATCC 14053 izolatına ait TEM görüntüleri.....	53
4.24. <i>C. albicans</i> ATCC 14053 6. saat SEM Görüntüleri	55
4.25. <i>C. albicans</i> 1766 6. saat SEM Görüntüleri.....	56

ŒEKİLLER DİZİNİ (devam)**Œekil****Sayfa**

4.26. <i>C. albicans</i> ATCC 14053 24. saat SEM Görüntüleri	57
4.27. <i>C. albicans</i> 1766 24. saat SEM Görüntüleri.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Cizelge

Sayfa

2.1. Biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesi (Subhadra vd., 2018)..... 29

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler**

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
dk	Dakika
g	Gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
mm	Milimetre
cm	Santimetre
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
µM	Mikromolar
α	Alfa
β	Beta

Kısaltmalar

ATCC	American Type Cultur Collection
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD PCR	Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda patojen küf ve mayaların sebep olduğu mantar infeksiyonlarında önemli bir artış gözlenmektedir. Özellikle bağışıklığı baskılanmış bireylerde, mantar infeksiyonları sonucu gözlenen morbidite ve mortalite oranları artmaktadır. En sık karşılaşılan etkenlerin biri de *Candida* cinsi mantarlar olup tedavide kullanılan ilaçların dar spektrumlu olması, toksisitesi ve dirençli suşların ortaya çıkması gibi sebeplerden dolayı tedavi de güçleşmektedir.

Candida türleri sağlıklı bireylerde normal flora üyesi olarak bulunurken, bağışıklığı baskılanmış bireylerde fırsatçı infeksiyonlara yol açabilmektedirler. Bu infeksiyonlar yüzeysel ya da sistemik olarak görülebilirken, özellikle hastanelerdeki nazokomiyal kan akımı infeksiyonlarının da temel sebepleri arasındadır. *C. albicans* en sık rastlanan patojen türü olmakla beraber son yıllarda *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. guilliermondii* türlerinin yol açtığı infeksiyonlar da sıkça rapor edilmektedir. *Candida* kaynaklı çoklu ilaç direnci gelişimi de en önemli klinik problemlerden biridir.

Biyofilmler, mikroorganizmaların bir yüzeye bağlanarak kendi ürettikleri ekstraselüler polimerik matrikse gömüldüğü organize komünitelerdir. Yok edilmeleri çok zordur ve pek çok ısrarcı infeksiyonun temel kaynağıdır. Biyofilm oluşumu, *Candida* türlerinin patojenitesine katkıda bulunan en önemli virülans faktörlerinden biridir ve mikroorganizmaları konakçı immun sistem savunması ya da antifungal ilaçlar gibi dış faktörlerden korumaktadır. Özellikle kalıcı kateterler ya da prostetik kalp kapakçıkları gibi implante araçların üzerinde gelişen biyofilm oluşumu büyük bir problem oluşturmaktadır (Douglas, 2003). Biyomateryal kaynaklı *Candida* infeksiyonları geleneksel tedavi yöntemlerine çok yüksek bir direnç göstermektedir.

Biyofilmler rastgele bir hücre topluluğu değil aksine çeşitli sinyal moleküllerinin kontrolü ile oluşturulan spesifik ve organize topluluklardır. Hücre-hücre sinyal iletiminde özellikle çoğunluk algılama (quorum sensing=QS) olayı son yıllarda büyük dikkat çekmektedir. Yapılan araştırmalar QS moleküllerinin biyofilm oluşumu için temel teşkil ettiğini göstermektedir. Şimdiye kadar bakteriler üzerinde yapılan QS molekülü çalışmaları

oldukça fazla iken fungal hücrelerdeki sinyal molekülleri üzerine çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Farnesol, *C. albicans*'ta hifal oluşumu inhibe eden bir QS molekülüdür ve biyofilm oluşumunu önlediği bulunmuştur. Ancak bu konudaki bilgiler çok sınırlıdır ve biyofilm oluşumuna karşı moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Çalışmamızda farnesolün farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde; biyofilm oluşumu öncesi ve biyofilm oluşumu sonrası etkilerinin detaylı biçimde araştırılması hedeflenmiştir. Yapılan çalışmalar genelde *C. albicans* üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak çalışmamızda farklı *Candida* türleri de araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Candida türleri doğada en yaygın bulunan maya mantarları olup ökaryotik ve tek hücreli yapıdadırlar. Klorofilsiz olup absorpsiyonla beslenen canlılardır. Doğada genel olarak saprofit olarak bulunmaktadır. Üremeleri tomurcuklanarak ya da ikiye bölünme ile olur. Blastokonidyumlar ana hücreden ayrılmadan uzayarak psödohif denilen yalancı hifleri oluşturabildiği gibi, bazen de gerçek hif oluşturabilirler (Dağ, 2007; Hösükoğlu, 2017).

Candida türleri insanlarda mukozal oral kavite, gastro intestinal alan ve vajinada normal mikrobiyota üyesi olarak bulunmaktadır. Bağışıklığın baskılandığı durumlarda ise kan akımı enfeksiyonları ya da sistemik enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Şimdiye kadar insanlarda enfeksiyonlara yol açtığı bilinen 17 türü rapor edilmiştir. İntravenöz kateterlerin kullanımı, total damar içi (parenteral) beslenme, invaziv prosedürler, geniş spektrumlu antibiyotiklerin giderek artan biçimde kullanımı, sitotoksik kemoterapi ve transplantasyon gibi faktörler *Candida* enfeksiyonlarının artışına katkıda bulunmaktadır. *Candida* türlerinin patojenitesine katkıda bulunan en önemli virülans faktörleri germ tüp oluşumu, konakçı epitel ve endotel hücrelerine adezyon, fenotipik dönüşüm, biyofilm oluşumu, hücre duvarı ve yüzey değişimi ile hidrofobisite ve hidrolitik enzimlerin üretimi sayılabilir. Özellikle *C. albicans*'ın maya morfolojisinden hifal morfolojiye geçebilme yeteneği en önemli virülans faktörlerinden sayılabilir ve hifal morfojenizin düzenlenmesinde hücre yoğunluğu çok kritik bir faktördür (Sardi vd., 2013; Deorukhkar vd., 2014).

Candida türlerinin insanların normal mikrobiyotasında bulunuşu, implante edilmiş biyomateryal yüzeyleri ile karşılaşmalarını kolaylaştırır. Stentler, şantlar, protezler, implantlar, endotrakeal tüpler, kalp pilleri ve çeşitli tipte kateterler gibi medikal cihazların *Candida* kolonizasyonu ve biyofilm oluşumunu desteklediği bilinmektedir. Özellikle kateter enfeksiyonlarının önde gelen nedenlerinden biri de bu mayalardır (Ramage vd., 2005).

Pek çok doğal çevrede mikroorganizmalar planktonik ya da serbest yüzen hücreler şeklinde değilde biyofilm şeklinde bulunurlar. Biyofilmler bir yüzeye yapışan mikrobiyal komünite yapısı olarak tanımlanmaktadır. Ekstraselüler polimerlerden oluşan bir matriks içine gömülen mikroorganizmalar, biyofilm oluşturduklarında kendi planktonik

formlarından farklı bir fenotip gösterirler. En önemli özellikleri de biyofilm içindeki mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlara duyarlılıklarının azalmasıdır. Biyofilm infeksiyonları, implantla ilişkili olabildiği gibi, kistik fibröz gibi aletle ilişkisi olmayan ve dokuda gelişen kronik infeksiyonları da kapsayabilmektedir (Douglas, 2003). İnfeksiyonlar tek bir mikrobiyal türle oluşabildiği gibi bazen bakteri-fungal türlerin bir arada olmasıyla da gerçekleşebilir (Costerton vd., 1999). Şimdiye kadar bakteriyal biyofilmler ve infeksiyondaki rolleri yoğun biçimde araştırılmış ve özellikle gram (-) bakterilerin biyofilmi hakkında önemli yapı ve özellik bilgileri sağlanmıştır. Ancak fungal biyofilmler çok daha az anlaşılmıştır. Cerrahi olarak en sık infekte olan implant araçları santral venöz kateterlerdir ve genellikle sitotoksik ilaçlar, çeşitli sıvılar ya da besinlerin uygulanması sırasında kullanılırlar. İnfeksiyonlar bu tip kateterlerin kullanımı sırasında ortaya çıkabilir. Burada infüzyon sıvısının kendisi ya da kateter merkezi kontamine olabileceği gibi hastanın derisinden ya da hastane personelinin elinden de geçiş olabilmektedir. Bazen kateterin distal ucu vücuda yerleştirilirken kontamine olabilir ya da mikroorganizmalar kateter yarasına geçebilir. Ancak eğer kommensal olarak gastrointestinal alanı kolonize eden *Candida* türleri intestinal mukozayı penetre ederek kan akımına geçerse kateter endojenöz yolla buradan da enfekte olabilir. Bu durum özellikle bağırsak mukozası hasarlı ve kemoterapi alan kanser hastalarında yaygın bir giriş mekanizmasıdır (Douglas, 2003).

Son yıllarda *Candida* infeksiyonlarının epidemiyolojisi değişiklik göstermeye başlamıştır. Şimdiye kadar klinik vakaların büyük çoğunluğunda invaziv kandidiyazın en temel etkeni *C. albicans* olarak bilinirken, non-*albicans Candida* (NAC) türleriyle infekte hasta sayısında önemli artışlar gözlenmektedir. Profilaktik ve terapötik ajan olarak sıkça kullanılan flukanazolun ilaca direçli suşların seleksiyonuna katkıda bulunması da bu değişimde önemli bir etkidir (Sanguinetti vd., 2015).

Antifungal ilaç direnci mikrobiyolojik ya da klinik olarak karakterize edilebilir. Mikrobiyolojik direnç fungal bir patojenin bir antifungal ajana karşı invitro duyarlılık testleriyle aynı türün diğer izolatlarına göre duyarsız olması olarak tanımlanır (Sanguinetti vd., 2015). Öngörülen direnç mekanizmalarının pek çoğu *Candida* biyofilmleri ile ilişkilidir ve oluşan direnç, antifungal ilaçların geniş bir spekturumuna karşı etkilidir. Bazen farklı ilaç mekanizmalarının kombinasyonu da dirençten sorumlu olmaktadır (Mishra vd., 2007).

Mikroorganizmalar biyofilm oluşum ve gelişim işlemlerini hücree-hücree sinyal molekülleri tarafından kontrol edilen ve populasyon yoğunluğuna bağlı gen ekspresyonları ile düzenlemektedirler (Houdt ve Michiels, 2005). Mantarlarda ise şimdiye dek en çok araştırılan QS sinyal molekülü, *C. albicans*'ta tespit edilen seskiterpen farnesoldür (3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol). Yapılan araştırmalarda azoller gibi sterol biyosentezi yolağını hedefleyen bazı ilaçların hücre içi farnesol düzeyini arttırdığı gösterilmiştir. Farnesol birikimi, yüksek hücre yoğunluklarında mayadan hif formuna morfolojik dönüşümü bloklar. Dışarıdan eklenen farnesol ise normal olarak serum, prolin, ya da N-asetil glukozamin tarafından tetiklenen germ tüp oluşumunu inhibe eder. Farnesolün germ tüp oluşumunu bloklamasına rağmen mevcut germ tüp uzamasını önleyemediği rapor edilmektedir. Bununla beraber bir QS molekülü olan farnesolün olası antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliklerinin detaylı biçimde araştırılması büyük bir önem taşımaktadır (Alem vd., 2006; Özkütük, 2007).

2.1. Mantarlar

Mantarlar ökaryotik, heterojenöz, tek hücreli ya da filamentöz yapılarda, spor oluşturabilen ve klorofil içermeyen organizmalardır. Birbirinden çok farklı özelliklerde olabilen bu ökaryotik organizmalar mantarlar âlemi adı altında sınıflandırılırlar. Mantarlar bitki, hayvan, protista ya da bakterilerden farklı özelliklere sahiptirler. Hücre duvarları kitin içermektedir ve genetik yapıları hayvanlara daha yakındır. Besinlerini absorpsiyon yoluyla çevrelerinden elde ederler. Çoğu saprofitik ya da parazitik yapıdadır. Tek hücre olarak boyutları 1-30 µm arasında değişmekte olup mikroskobik funguslar misel ya da maya formunda olmaktadır. Üç temel morfolojiye sahip olup bu formlar tek hücreli maya formu, filamentöz misel formu ve maya benzeri psödohif formudur (Samanta, 2015).

Miseller uzun ve dallanmış yapıda ve hif adı verilen filamentler içeren çok hücreli yapılardır. Vejetatif ya da reproduktif hif yapıları bulunmaktadır ve sporlar reproduktif hif üzerinde gelişir. Mantarların sınıflandırılmasında spor boyutu, şekli ve yapısı önemlidir. Makroskobik küf kolonisi genellikle kabarık ve yumuşak olup karakteristik bir görünüme sahiptir. Hif ve diğer yapılar bir araya gelerek miselyum adı verilen kompleks bir yapı oluştururlar.

Mayalar ise yaklaşık 5-8 µm boyutlarında tek hücreli organizmalar olup nadiren filament oluştururlar. Çoğunlukla tomurcuklanma yoluyla ürerler. Bakterilere benzer şekilde düz yüzeyli koloniler oluştururlar (Anonim, 2014).

Sıcaklığa bağlı olarak hem maya hem de küf formu oluşturabilen mantarlar dimorfik yapıdadır. Bu olay termal dimorfizm olarak adlandırılır. İnsan vücudunda 37 °C'de üreyebilen maya formunun yanı sıra çevrede ve yapay kültür ortamında ve oda sıcaklığında üreyebilen form hif formudur. Psödohif formu ise *C. albicans* tarafından üretilebilmekte olup uzamış elipsoidal hücrelerin bir zincir yapısı oluşturmasıyla karakteristiktir (Samanta, 2015).

Mantarlar genellikle hif, spor ve üreme tiplerine göre sınıflandırılmaktadırlar. Buna göre Opisthosporidia, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Zoopagomycota, Glomeromycota, Basidiomycota, Mucoramycota ve Ascomycota olarak 9 takıma ayrılmaktadırlar (Naranjo-Ortiz ve Gabaldon, 2019).

2.1.1. *Candida* cinsi mantarlar

Candida türleri ökaryotik ve tek hücreli yapıda olup *Ascomycota* içerisinde ve Saccharomycotina sınıfına ait maya mantarlarıdır. Doğada çok yaygın olarak bulunurlar ve hücre duvarlarında kitin içerirler, kapsülsüz, oval ve hareketsiz mayalardır. İkiye bölünme ve tomurcuklanma yoluyla üreyebilmektedirler. Blastospor ile üreme sırasında blastokonidyumların ana hücreden ayrılmaması sonucu pseudohif oluştururlar. *C. albicans*, *C. dubliniensis* ve *C. norvegensis* dışındaki türler genellikle yalancı hif oluşturma yeteneğinde değildir (Dağ,2007; Hösükoğlu, 2017; Şimşek, 2018; Naranjo-Ortiz ve Gabaldon, 2019).

Candida cinsi insanlardaki fungal infeksiyonlardan en sıklıkla izole edilen tür *C. albicans*'tır. Ancak son yıllarda NAC türlerinin karşılaşılma sıklığında önemli bir artış gözlenmektedir. Yapılan araştırmalara göre *Candida* türleri fungal infeksiyonlara en çok yol açan mantarlardır. İnfeksiyonların yaklaşık % 90'ı *C. albicans*, *C.glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* tarafından oluşturulmaktadır. Bu infeksiyonlar yüzeysel ya da sistemik olabilmektedir (Turner ve Butler, 2014).

2.1.2. *Candida* türlerinin sınıflandırılması

Candida türleri sınıflandırmada *Ascomycota* içerisinde *Saccharomycotina* sınıfında yer alan maya mantarlarıdır. Tek hücreli, tomurcuklanma ile çoğalan, psödohif ve bazen gerçek hif oluşturan mikroorganizmalardır. Bilinen yaklaşık 200 türü bulunmaktadır. Pek çok *Candida* cinsi mayanın eşeyli formunun (telomorf) bilinmemesi, sınıflandırmada zorluklara yol açmakta ve moleküler tekniklerle bu sorunun aşılmasına çalışılmaktadır. Bu çalışmalarda telemorfları ortaya çıkarılan *Candida* türlerinin gerçekte farklı cinslere ait olduğu görülmüştür (Daniel vd., 2014; Naranjo-Ortiz ve Gabaldon, 2019).

2.1.3. *Candida* türlerinin morfolojik özellikleri ve boyanma durumları

Candida türleri küresel ya da oval şekillerde, 2-8 x 3-15 µm boyutlarında, kapsülsüz ve hareketsiz, ökaryotik mikroorganizmalardır. Tomurcuklanma ile oluşan yavru hücreler ana hücrenin aynısıdır. Bazen ana hücreden ayrılırken bazen de ayrılmadan psödohif şeklinde zincir oluşturabilirler. Gerçek hifler ise septalı ve düzgün kenarlı biçimdedir. Maya, psödohif ve gerçek hif morfolojileri dokularda ve kültürde görülebilmektedir. En sık olarak *C. albicans*, daha nadir olarak da *C. dubliniensis* ve *C. norvegensis* türleri gerçek hif oluşturabilmektedir. *C. albicans*'ın hızlı tanısında germ tüp testi olarak da bilinen, 37 °C'de 2 saatte çimlenme borusu oluşumunun varlığı büyük önem taşımaktadır. Çimlenme borusu hif oluşumunun temel başlangıç safhasıdır. Yapılan araştırmalar *C. albicans*'taki maya hif dönüşümünün patojenezde çok etkili olduğunu ve hifal formun doku invazyonu için önemini ortaya koymaktadır. Bu dönüşüm sıcaklık, pH, glikoz seviyeleri, azot kaynağı, karbondioksit seviyeleri veya başlangıç hücre yoğunluğu gibi birçok farklı kimyasal ve çevresel faktör tarafından indüklenir (Ramage vd., 2002). Hücre yoğunluğu $\geq 10^6$ hücre/ml olduğunda maya hücreleri hife doğru bir dönüşüm göstermez. Ancak yoğunluk $< 10^6$ hücre/ml olduğunda ise misel olarak gelişmektedir. Bu durum inokulum boyut etkisi olarak da bilinir ve funguslarda çok önemlidir. Germ tüp testinin yanı sıra Mısır Unlu Tween 80'li veya uygun besiyeri ortamında klamidospore oluşumu incelenmesi de tanıda önemlidir. Klamidospore kalın duvarlı, maya hücresinin açığa ve değişik koşullara karşı dayanıklılık sağlayabilen yapılardır. *Candida* türleri gram boyama ile pozitif olarak boyanırlar. Klinik örnekler içinde maya aranması çalışmalarında, Calcofluor White Fluorescent boyası kullanılır ve hücre duvarındaki kitine non spesifik olarak bağlanma sonucu yeşil-mavi floresan renk meydana

gelir. Potasyum hidroksit (%10-20 KOH ve %10 gliserin) çözeltisi de mantar ve maya hücrelerinin tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çözeltide bulunan gliserin mayanın bozulmasını önlerken KOH da keratini eritir. Laktofenol pamuk mavisini ya da giemsa boyaları da maya hücrelerinin boyanmasında kullanılmaktadır (Bozkurt, 2008).

2.1.4. *Candida* türlerinin identifikasyonları

Candida türleri Patates Dekstroz Agar (PDA), Kanlı Agar, Saburo Dekstroz Agar (SDA), Yeast Nitrogen Base (YNB) gibi kültür besiyerlerinde ya da CHROMagar gibi seçici besiyerlerinde üreyebilmektedirler. Diğer yandan *Candida* türlerinin üretilmesinde, bakteri ve küf üremesini engellemek için primer izolasyon besiyerine penisilin, kloramfenikol ya da sikloheksimid eklenebilmektedir. Steril vücut sıvıları ya da doku örneklerinin Triptikaz Soy Kanlı Agarda geliştirilmesi önerilmektedir (Madhavan vd., 2011). Kültüre alınan örnekler hem oda sıcaklığı hem de 37 °C'de inkübe edildiklerinde saprofit mayaların sadece oda sıcaklığında üreyebildiği görülmektedir. Çoğu patojen *Candida* türü hem 26 °C hem de 37 °C'de üreyebilmektedir. Ayrıca *Candida* türlerinin koloni rengine göre teşhisine olanak veren kromojenik besiyerleri de bulunmaktadır. Bu besiyerleri mikroorganizma tarafından salgılanan enzimlerle tepkimeye giren kromojenik substratlar kapsadığından, substratların o türe özgü enzimleri ile hidrolize olması sonucu değişik renk ve morfolojiye sahip koloniler gözlenmektedir (Gültekin vd., 2013).

Candida türlerinin optimum üreme pH'ları 4,5-5'tir. Ama pH 2-8 arasında da üreyebilirler. 24 saatte üreme olurken, 48-72 saatte belirgin üreme gözlenir. Besiyerinde düzgün yüzeyli, krem renkli ve tipik maya kokulu S tipi koloniler oluştururlar, R tipi koloniler ise misel gelişimi ile ilgilidir (Yüksekkaya, 2009).

Otomatize kültür sistemleri ile mikrobiyal hücrelerin metabolik aktivitesi sırasında açığa çıkan karbondioksitin izlemesi sağlanmakta ve çok hassas bir şekilde mikroorganizma tayinleri yapılabilmektedir. Hastane laboratuvarlarında maya identifikasyonunda kullanılan çeşitli BACTEC sistemleri bulunmaktadır (Han, 2006).

Candida türlerinin identifikasyonunda hem geleneksel hem de ticari sistemler kullanılabilir. Yukarıda da bahsedilen çimlenme borusu testi, Mısır Unlu Tween 80

Agar besiyesindeki morfoloji, karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon testleri geleneksel yöntemleri kapsarken, ticari karbonhidrat asimilasyon testleri de bulunmaktadır. Karbonhidrat fermentasyon testleri ile mayaların karbonhidratları fermente edebilme yetenekleri incelenirken, asimilasyon testlerinde mayaların tek karbon ya da azot kaynağı olarak verilen substratı kullanabilme durumları belirlenir. Klinik *Candida* izolatlarında *C. krusei* dışındaki türlerde üreaz enzimi yoktur ve bu da teşhiste kullanılan önemli bir özelliktir. Tüm bunların yanı sıra RAPD PCR, Real Time PCR ya da Restriksiyon Enzim Analizi gibi DNA tabanlı yöntemler de patojen mantarların teşhisinde kullanılabilir. Bu moleküler metodlar bir organizmaya spesifik bir genin nükleik asit sekansının tespitine dayanmaktadır. Prob bağlı identifikasyon testlerinde ise mikroorganizmanın tek zincirli DNA ya da RNA'sı tamamlayıcı bir sekansa bağlanır ve çift zincirli bir hibrid oluşturur (Bozkurt, 2008; Yüksekaya, 2009; Koç, 2007)

2.1.5. *Candida* türlerinin hücre yapısı

Candida türleri ökaryotik ve tek hücreli mikroorganizmalardır. Hücre duvar yapısı bakterilerden oldukça farklı iken, sitoplazma zar yapıları insan hücre sitoplazmik zar yapısına benzemektedir. *Candida* türleri ökaryotik hücre yapısında olduklarından, fungal infeksiyonların tedavisinde kullanılan ilaçlar insan hücreleri üzerine de toksik etkiler göstermektedir. Bu sebeple mevcut antifungal tedavi stratejileri antibiyotiklere göre çok daha sınırlıdır.

Candida hücresinin en dış kısmında bulunan ve sert bir yapıda olan hücre duvarı hücreyi korur, şekil verir ve ozmotik basınca bağlı lizisten korur. Moleküllerin iç ve dış ortama geçişlerinde rol alır ve hücrenin çeşitli yüzeylere adezyonunu sağlar. Hücre duvar elemanları antifungal ilaçların tasarlanmasında önemli bir hedef oluşturmaktadır. Hücre duvarında karbonhidrat (%80-90), protein (%5-15) ve lipid (%2-5) yer almaktadır. Karbonhidratların büyük çoğunluğu β -glukan iken, mannoprotein ve kitin de bulunmaktadır. Hifal hücrelerde kitin miktarı daha fazladır.

Hücre duvarı altında yer alan hücre membranı, içerdiği ozmoenzimler ile hücre içi ve dışına madde geçişlerinde önemli bir görev almaktadır. Hücre duvar sentezinde görev yapan kitin sentataz enzimi *C. albicans*'ın da membranında bulunmaktadır.

Fungal hücre iskeleti yapısı da turgor basıncına karşı koyar ve dinamik bir yapıdır. Yapıdaki mikrotübüller membran hareketliliğinde görevlidir. İskelet yapısı hem hücre duvarı hem de membran ile ilişkilidir. Aktin ve miyozin de stoplazmik akışkanlık ya da organel hareketliliği gibi faaliyetlerde görev almaktadır (Bozkurt, 2008)

2.1.6. Tıbbi açıdan önemli *Candida* türleri

2.1.6.1. *Candida albicans*

C. albicans insan normal mikroflorasının önemli bir kommensali olup, deri ve mukozal membranlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Ancak bağışıklığın baskılandığı durumlarda önemli infeksiyonlara yol açabilmektedirler. Aynı zamanda hastane, besin ya da çeşitli medikal ekipmanlardan sıklıkla izole edilirler. Maya benzeri bir fungus olup blastokonidya, psödohif ve gerçek hif oluşturabilmektedir. Gerçek hif oluşumunun başlangıcında gözlenen germ tüp yapısı, sadece *C. albicans* ve *C. dubliniensis* türlerinde gözlenmektedir. *C. albicans*'ın laboratuvar tanısında bu özellik anahtar rol oynamaktadır. Ayrıca tipik eşeysiz bir spor yapısı olan klamidyokonidyum oluşumu da bu tür için karakteristiktir. Bu yapı, gerçek ya da yalancı hifin ucunda veya yanında bulunur; kalın duvarlı, geniş oval yapılı ve tek hücreli şekildedir (Bozkurt, 2008; Dağ, 2007; Larone, 1995).

2.1.6.2. *Candida glabrata*

C. glabrata yüzeysel ya da sistemik *Candida* infeksiyonlarına yol açan en önemli türlerdendir. *C. glabrata* dimorfik olmayan blastokonidyal morfolojisi ve haploid genoma sahip olması ile diğer *Candida* türleri ile farklılık gösterir. İmmünespresif tedavi ve geniş spektrumlu antimikrobiyallerin sık kullanımı sonucu *C. glabrata*'nın yol açtığı infeksiyonların sıklığı artış göstermiştir. Flukonazol gibi pek çok azole antifungal ajana dirençli olduklarından infeksiyonların tedavisi de güçleşmektedir. Özellikle hastanede yatan hastalarda yüksek mortalite oranları görülmektedir. *C. glabrata* 37 °C üzerindeki sıcaklıklarda psödohif üretmeyen tek *Candida* türüdür (Fidel vd., 1999).

2.1.6.3.Candida tropicalis

Diploid bir *Candida* türü olan *C. tropicalis* ozmotolerant bir mikroorganizmadır ve yüksek tuz konsantrasyonlarında hayatta kalabilir. Bu özelliği ile biyoteknolojik proseslerde kullanım için ilgi çekicidir. Psödohif ve gerçek hif oluşturabilir. Blastokonidyaları küresel ya da ovoid şekildedir. Güçlü bir biyofilm üreticisi olarak tanımlanmaktadır. Azole, poliyen, ve ekinokandin gibi antifungal ilaçlara direnç gösterdiği rapor edilmektedir. İnsan normal mikrobiyotasının bir elemanıdır ancak bağışıklığın baskılandığı durumlarda yüzeyel ve sistemik infeksiyonlara yol açabilir. *C. tropicalis*'in, *C. albicans*'la, diğer *Candida* türlerine göre daha fazla genetik benzerliği olduğu bilinmektedir (Butler vd., 2009; Zuza-Alves vd., 2017).

2.1.6.4.Candida parapsilosis

C. parapsilosis oval, yuvarlak ya da silindirik şekilli hücrelere sahip olan ve gerçek hif üretmeyen bir maya türüdür. Maya ya da psödohif formunda bulunmaktadır. İnsanlar dahil memelilerde normal mikrobiyota üyesi olup mukoza, deri ve tırnaklardan izole edilebilmektedir. İnvaziv kandidiyazın önemli etkenlerinden biridir ve kateter ilişkili infeksiyonlarda sıklıkla rapor edilmektedir. Mikroskobik olarak en önemli özellikleri arada iri hiflerin oluşturduğu dev hücreleri içermesidir (Dağ, 2007; Trofa vd., 2008).

2.1.6.5.Candida krusei

C. krusei kaynaklı infeksiyonlar hem bağışıklığı baskılanmış hem de hastanede yatan bireylerde önemli bir artış göstermektedir. Flukonazole doğal dirençli bir tür olması ve *C. krusei* infeksiyonlarında amfoterisin B'nin genellikle yetersiz kalması ciddi bir sorun oluşturmaktadır. Özellikle hematolojik malignansi ve nakil alıcısı hastalar için büyük risk oluşturmaktadır. Doğal flukonazole direncinin yanı sıra flusitozin ve amfoterisin B'ye azalan duyarlılığı sebebiyle potansiyel bir çoklu ilaç direnci patojenidir. Morfolojik görünümünde dallanmış psödohifler ve bu hiflerin septalarında ağaç benzeri blastokonidyumlar görülmektedir (Dağ, 2007; Pfaller vd., 2008).

2.1.6.6. Candida kefyr

Daha önceleri *Candida pseudotropicalis* olarak adlandırılan bu tür özellikle hematolojik malignanslı hastalarda önemli bir patojendir. Süt ürünlerini de içeren farklı habitatlardan izole edilebilmektedir. Nadir bir infeksiyon ajanıdır. Mikroskopik morfolojisinde psödohipler ve bu hiplerin etrafında birbirine paralel ve hiften ayrı dizilim gösteren blastokonidyumlar yer almaktadır (Corpus vd., 2004; Dağ, 2007).

2.1.7. Epidemiyoloji

Candida türleri, insanlarda gastrointestinal sistem, ağız boşluğu ve vajinal bölge mukozalarında normal mikrobiyota üyesi olarak yer almaktadır. Buna rağmen geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı, total parenteral beslenme, santral venöz kateterler, cerrahi, AIDS, organ nakli, diyabet, şiddetli sepsis ve kan dolaşımı infeksiyonları gibi bağışıklığın baskılandığı durumlarda önemli infeksiyonlara yol açabilmektedir (Ortega vd., 2010; Ahmed vd., 2014). Tanımlanan çok fazla *Candida* türü olmasına rağmen, insan infeksiyonlarının etiyolojik ajanları olarak bilinenler çok sınırlıdır. Sardi vd. (2013), invazif infeksiyonların % 90'ından fazlasının *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* kaynaklı olduğunu rapor etmişlerdir (Sardi vd., 2013).

C. albicans oral pamukçuk kandidiyaz ve kandidemiden sorumlu en önemli türdür ve vulvovajinitenin de en önemli etmenidir. Son yıllarda kan akımı infeksiyonları gibi pek çok klinik durumda NAC türlerinin görülme sıklığından önemli bir artış görülmektedir. Yeni doğanlarda invaziv kandidiyaz çok önemlidir ve ölümcül olabilir. Prematüre bebeklerde görülen sepsisin de en önemli etmenlerindedir. *Candida* infeksiyonları anneden bebeğe vajinal infeksiyon yoluyla geçebildiği hastane kaynaklı olarak da edinilebilir (Singh vd., 2013).

Candida türlerinin taksonomik ilişkileri tam olarak aydınlatılmamıştır. 200'den fazla türü olduğu bilinen *Candida* türlerinin küçük bir kısmı insanlar için patojendir. Patojenik olarak en çok karşılaşılan tür *C. albicans* olmakla birlikte *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. guilliermondii* de diğer patojen türler arasında yer almaktadır. Hastalık etkeni olabilen diğer önemli türler; *C. catenulata*, *C. ciferii*, *C. haemulonii*,

C.intermedia, *C. kefyr*, *C. lambica*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. pelliculosa*, *C. pulcherrima*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C.viswanathii* ve *C. zeylanoides*'tir. Bu sayı ve sıralama gün geçtikçe değişebilir (Hösükoğlu, 2017).

İnvaziv kandidiyazın en yaygın risk faktörlerinden biri vücut içi medikal cihazlardır; vasküler katetere sahip olan hastalar bu risk grubunun neredeyse %80'ini oluşturmaktadır. *C. albicans* medikal cihazlar üzerinde biyofilm oluşturarak ortama adapte olmaktadır (Johnson vd., 2016).

Candida türleri, hem oral ve vajinal mukozada yüzeysel infeksiyonlara hem de yaygın kan dolaşımı ve derin doku infeksiyonlarına neden olabilmektedir. İnfeksiyon çeşitleriyle ilişkili türler bölge ve coğrafyaya göre değişiklikler göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ve Orta Doğu'daki epidemiyolojik çalışmalarda, *Candida* infeksiyonlarına en fazla *C. albicans*'ın neden olduğu belirtilmiştir. Tüm NAC türleri içerisinde *C. glabrata*'nın Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'daki kandidemi hastalarından izole edilen en yaygın tür olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *C. glabrata*, vulvovajinal kandidiyaz ve kandiduriye sebep olan NAC türlerinin başında gelmektedir (Whaley vd., 2017).

2.1.8. Patojenite ve virülans faktörleri

Candida türlerinin patojenitesi konakçının savuma sisteminin durumuna bağlıdır. Sıklıkla deri ve mukozal yüzeylerde kommensal olarak bulunan *Candida* türleri, konakçı savunması zayıfladığında infeksiyona yol açabildiklerinden fırsatçı patojen olarak tanımlanmaktadır (Hösükoğlu, 2017). Son yıllarda intravenöz kateterlerin sıkça kullanımı, diyabet, AIDS, organ transplantasyonları, geniş spektrumlu antibiyotikler ya da sitotoksik kemoterapi bu infeksiyonların artışını hızlandırmaktadır (Ortega vd., 2011).

Candida cinsi içerisinde patojenitesi ve görülme sıklığı en fazla olan tür *C. albicans*'tır. Çeşitli virülans faktörlerini içeren bu tür hem infeksiyonun yayılmasına hem patojenitenin artmasında önem arz etmektedir. *C. albicans*'ın virülans faktörleri özellikle solunum sistemindeki epitelyal hücrelere ve kan damarlarındaki endotelial hücrelere yapışarak psödohif oluşumunda; hifal dönüşümde, proteinaz ve fosfolipaz gibi ekstrasellüler hidrolitik enzimlerin üretiminde önemli bir rol oynamaktadır (Singh vd., 2013).

Maya ve hifal form arasındaki geçiş dimorfizm olarak adlandırılır ve her iki formun da patojenite de önemli olduğu düşünülmektedir. Ancak yapılan çalışmalar hifal formun daha yayılıcı olduğunu desteklemektedir (Mayer vd., 2013).

Fenotipik değişim, fırsatçı bir patojen olan *C. albicans*'da gözlenen ve ökaryotlar için çok güzel bir örnek oluşturan diğer bir virülans faktörüdür. Polimorfik bir fungus olan bu tür genel olarak ovoid şekilli, tomurcuklu bir mayadır. Diğer yandan psödohif ya da gerçek hif içeren elipsoid hücreler şeklinde de görülebilir. Bu dönüşüm sürecinde hücreler beyaz ve opak morfolojiler oluştururlar. Bu hücresel fenotipler geri dönüşebilir ya da kalıcı olabilir. Beyaz hücreler yuvarlak, düz ve kubbeli bir koloni yapısındayken, opak hücreler fasulye şeklinde, daha yassı ve şeffaf görünümündedir. Fenotipik değişim olayı çok sık görülen bir olay değildir, ortalama 10.000 hücre bölünmesinde bir görülür. Ancak bu olayın patojenite ve biyofilm oluşumunu etkilediği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (Alby ve Bennett, 2009).

Tüm *Candida* türleri aspartil proteinaz 5 ve 9 (SAP5–SAP9) salgılar. Yapılan araştırmalar fagositik hücreler tarafından maya hücrelerinin sindirimini takiben SAP antijenlerinin eksprese edilmesinin patojenezde önemli olabileceğini göstermektedir (Borg ve Ruchel, 1990; Ruchel vd., 1986). Diğer yandan fungal invazyon maya formundan hif formuna geçiş süreciyle daha da kolaylaştırılmaktadır (Cullen ve Sprague, 2012).

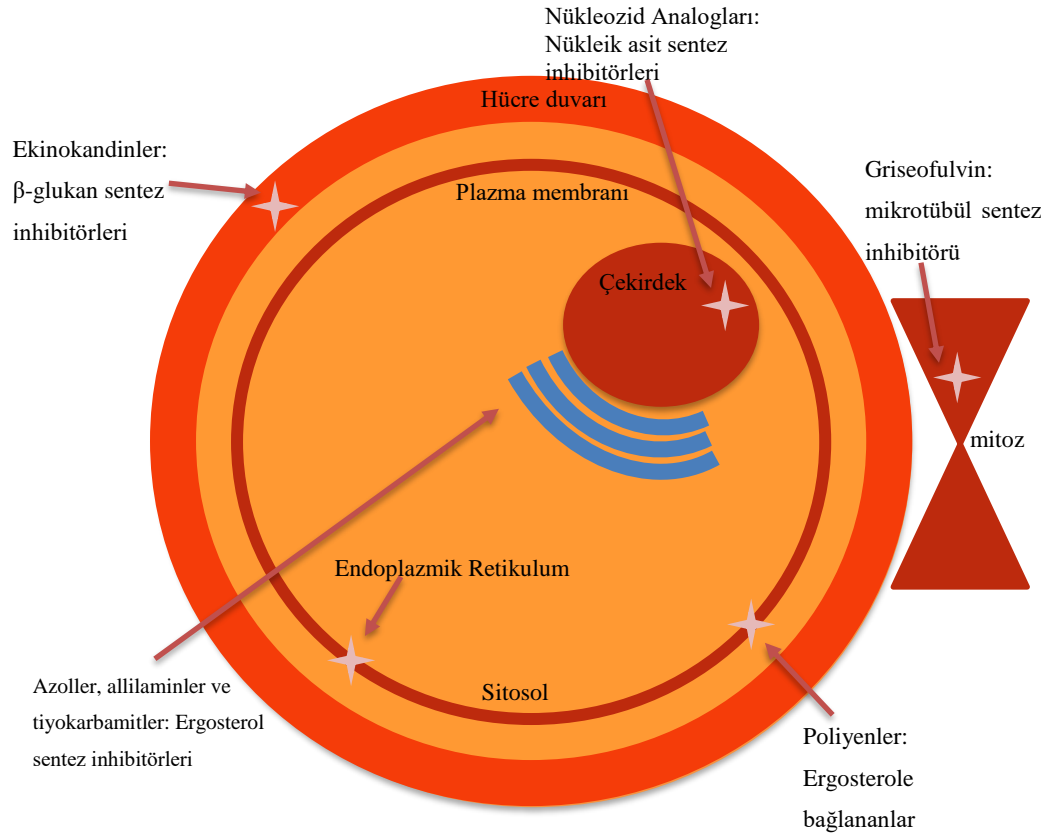
Candida virülansında rol oynayan diğer önemli bir faktör de hemolizin üretimidir. Bu protein mikroorganizmalar tarafından üretilmekte ve kırmızı kan hücrelerinin yıkımına yol açmaktadır. Bu sebeple enfeksiyonun belirlenmesinde hemolizinin tespiti önemlidir (Sardi vd., 2013).

İnsan dokularındaki fungal kolonizasyonun temel faktörü konakçı yüzeyine adherensdir. Bu proses fungus ve çevre arasındaki hücre sinyal iletimiyle kontrol edilir. *Candida* türleri çeşitli tıbbi yüzeyler üzerine de yapışarak biyofilm oluşturmaktadırlar. *Candida* hücrelerinin başlangıç yapışması spesifik olmayan faktörlerle sağlanır. Hidrofobisite ve elektrostatik güçler bu faktörler arasında sayılabilir. Yine başlangıç yapışma aşamasında fungal hücre yüzeyinde bulunan spesifik adhezinler protein, fibrinojen ve fibronektin gibi ligantları tanıma özelliğindedir. Adhezyon olayı adhezin adı verilen

özelleşmiş yüzey proteinleri tarafından gerçekleştirilir. Bu adhezinler diğer hücrelerin yüzeyindeki şeker ve aminoasitlere spesifik olarak bağlanmakta ya da abiyotik yüzeylere adherensi uyarmaktadırlar. İnsan mikrobiyotasının önemli bir kısmını oluşturan *Candida* türleri implant, takma diş ve kateter gibi çeşitli biyomateryaller üzerinde biyofilm şeklinde sıkça bulunurlar. Temel olarak biyofilm, maya hücresinin bir substrata yapışması, çoğalması, hifal hücreler oluşturması, Ekzopolisakkarit (EPS) matriks biriktirmesi ve biyofilm ortamından etrafa yayılmasını içeren ardışık olaylar kompleksidir. Yüzeyler üzerinde biyofilm şeklinde bulunan organizmalar antifungal tedaviye artan bir direnç gösterdiklerinden önemli bir klinik problem haline gelmişlerdir. Biyofilm matriksi, ilaç atım pompalarının aşırı ekspresyonu ve metabolik plastisitenin bu olaydan sorumlu olduğu düşünülse de, oluşan direncin mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Sardi vd., 2013; Mayer vd., 2013).

2.2. *Candida* Türlerinde Antifungal Tedavi

Klinik tedavide kullanılan çeşitli antifungal ilaç çeşitleri bulunmasına rağmen mukozal ve sistemik *Candida* infeksiyonlarını tedavide kullanılan antifungal ajan sınıfları çok sınırlıdır. Çeşitli antifungal ajanların temel hedefleri ve etki mekanizmaları Şekil 2.1’de özetlenmiştir:



Antifungal sınıfı	Etki mekanizması	İlaçlar
Azoller	Lanosterol 14- α -demetilaz İnhibitörleri	Mikonazol Ekonazol Klotrimazol Ketokonazol Flukonazol İtrakonazol Vorikonazol Posakonazol
Ekinokandinler	(1,3)- β -D-glukan sentez İnhibitörleri	Kasprofungin Mikafungin Anidulafungin
Poliyenler	Ergosterole Bağlananlar	Nistatin Amfoterisin B Flusitozin
Nükleozid Analogları	DNA/RNA sentez İnhibitörleri	
Allilaminler	Skualen-epoksidaz İnhibitörleri	Terbinafin Amorolfın Naftifin
Tiyokarbamitler	Skualen-epoksidaz İnhibitörleri	Tolnaftat Tolsiklat
Antibiyotik	β -tübülün ile etkileşenler	Griseofulvin

Şekil 2.1. Çeşitli antifungal ajanların etki şekilleri ve birincil hedefleri (Spampinato ve Leonardi, 2013)

Azol grubu ilaçlar: Antifungal ilaçların en geniş sınıfı azol grubunda yer almaktadır. Bu gruptaki ilaçlar ergosterol biyosentezinde görevli bir enzim olan lanosterol 14-alfa-demetilaz enzim aktivitesini inhibe ederek hücre membranını bozarlar. Hayvan hücrelerinden temel sterol yapı kolestrol iken fungal hücre membranındaki ergosterol, antifungal ilaçlar için en önemli hedeflerden biridir. Azol grubu ilaçların çoğu topikal olarak invaziv fungal infeksiyonların profilaksisi ve tedavisinde kullanılmaktadır (Spampinato ve Leonardi, 2013).

Ekinokandin grubu ilaçlar: Ekinokandinler memeli hücrelerinde bulunmayan ancak temel bir fungal hücre duvarı olan β -(1,3)-D-glukansentaz enziminin non-kompetitif inhibitörüdür. Organizma β -(1,3)-D-glukanı sentezleyemediğinde ozmotik kararsızlık sebebiyle fungal hücre ölmektedir. Yarı sentetik olan bu ilaç *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii* üzerine fungisidal etkilidir. Amfoterisin B ve flukonazol dirençli *C. glabrata* üzerine de etkilidir. Kaspofungin, mikafungin ve anidulafungin gibi ilaç sınıfları bulunmakta ve intravenöz olarak uygulanır (Grover, 2010).

Poliyen grubu ilaçlar: Fungal membranda yer alan ergosterole bağlanarak membran geçirgenliğini bozar ve porlar oluştururlar. Sitoplazma içeriğinin bu porlardan dışarı sızması sonucu fungal ölüm meydana gelmektedir. Bu gruptaki en önemli ilaçlar nistatin ve amfoterisin B'dir. Özellikle amfoterisin B hayatı tehdit eden mikozların tedavisinde çok etkilidir. Ancak renal toksisitesi ilaç kullanımını sınırlayıcı bir faktördür (Malayeri vd., 2018).

DNA/RNA sentez inhibitör grubu ilaçları: Bu gruptaki en önemli ilaç flusitozindir. Sitozin permeaz enzimi aracılığıyla hücrede sitozin 5-florasitazine dönüştürülür. Ve bu madde RNA'daki urasilin yerini alarak protein sentezi inhibisyonuna neden olur. Etki spektrumu dardır. Ancak *Candida* türleri üzerine etkilidir.

Diğer antifungal ilaçlar: Alilamin ve thiocarbomate antifungalleri squalen epoksidaz enzimini inhibe ederek ergosterol biyosentezine ve dolayısıyla hücre membranının bozulmasına yol açarlar.

Griseofulvin ise fungal mitozu inhibe ederek etki gösterir (Spampinato ve Leonardi, 2013).

2.3. *Candida* İnfeksiyonları

Candida türlerinin yol açtığı infeksiyonlar lokal, mukoz membran infeksiyonundan yayılcı infeksiyona kadar değişen oranlarda seyretmektedir. Normalde insanların mide-bağırsak, genital ve üriner alanlarındaki normal flora üyesi olarak kabul edilmelerine rağmen ilgili mikrobiyotada bir dengesizlik oluştuğunda çoğalarak hastalığa yol açma eğiliminde olurlar. AIDS gibi hastalıklarda daha geniş ve ısrarcı mukoz membran infeksiyonlara yol açarlar. En yaygın etmen *C. albicans* iken, farklı *Candida* türleri de hastalığa yol açabilir. İnfeksiyon etkeni olan organizmanın iyi tanımlanması gerekir çünkü bazı türlerde azol direnci daha fazla olabilmektedir (Gülbaşaran ve Gençoğlan, 2019; Özhak, 2019).

Candida kaynaklı kan dolaşımı infeksiyonları kandidemi olarak adlandırılır ve özellikle sağlık kurumlarında sık karşılaşılan infeksiyon nedenlerindedir. Yoğun bakım ünitelerinde de invaziv kandidiyaz en sık görülen fungal infeksiyonlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Kardiyovasküler *Candida* infeksiyonları da fungal etiolojide çok sık gözlenirse de önemli bir mortalite sebebidir. Santral sinir sistemi *Candida* infeksiyonları da giderek artan bir insidans ile yüksek morbidite ve mortalite oranlarında sahiptir. *Candida* türleri maya mantarları içerisinde dünyada oküler infeksiyona yol açan en önemli etiolojik ajanlardandır. Keratit olarak kornea hastalığı şeklinde ya da koryoretinit ve endoftalmi olarak gözlenebilir. Gastrointestinal sistem bariyeri bozularak *Candida* türlerinin karın boşluğuna yayılması durumunda ise intraabdominal kandidoz tablosu görülmektedir. Uzun süreli nütropeni atağı olan ve hematolojik maligniteli hastalarda kronik dissemine kandidiyaz tablosu görülmektedir. Bu hastalıkta lezyonlar daha çok karaciğer ve dalağa yerleşir. Üriner sistemdeki *Candida* infeksiyonları ise oldukça sık gözlenen bir tablodur. Kadınlarda çok sık rastlanan vulvovajinal kandidiyaz üreme çağındaki kadınların %75'inde yaşam boyunca en az bir kere görülür. Antibiyotik kullanımı, şeker ya da rahim içi araç kullanımı gibi faktörler hastalık riski artmaktadır. Kandida kaynaklı kemik eklem infeksiyonlarının da insidansında artış gözlenmektedir (Kaya, 2019; Erdem ve Işıkgöz Taşbakan, 2019; Sayın Kutlu, 2019; Mayalı, 2019; Kutlu, 2019; Çetin, 2019; Avkan Oğuz, 2019; Turhan, 2019).

2.4. *Candida* Türlerinde Antifungal Direnç

Antifungal ilaç direnci mikrobiyolojik ya da klinik olarak karakterize edilebilir. Mikrobiyolojik direnç fungal bir patojenin bir antifungal ajana karşı invitro duyarlılık testleriyle aynı türün diğer izolatlarına göre duyarsız olması olarak tanımlanır. Doğal ya da edinilmiş olarak kategorize edilir. Doğal direnç ilaca maruziyet olmaksızın belli fungal suşların doğal olarak gösterdiği dirençtir. Edinilmiş direnç ise normalde duyarlı olan fungal izolatların ilaç maruziyetini takiben geliştirdikleri direnç olarak tanımlanır ve sıklıkla gen ekspresyonundaki değişimlerin sonucu olarak meydana gelir. Bunların aksine klinik direnç ise yeterli tedaviye rağmen fungal infeksiyonun ısrarlı biçimde devam etmesi olarak tanımlanır. Mikrobiyolojik direnç klinik direnç gelişimine katkıda bulunabiliyorken immun fonksiyonun bozulması, altta yatan hastalıklar, azalmış ilaç biyoyumluluğu gibi faktörler de önemli olmaktadır (Sanguinetti vd., 2015). Öngörülen direnç mekanizmalarının pek çoğu *Candida* biyofilmleri ile ilişkilidir ve oluşan direnç, antifungal ilaçların geniş bir spekturumuna karşı etkilidir. Bazen farklı ilaç mekanizmalarının kombinasyonu da dirençten sorumlu olmaktadır (Mishra vd., 2007).

Candida türleri özellikle kan akımı infeksiyonlarında yüksek mortaliteye yol açan önemli patojenler arasındadır. *C. albicans* ve *C. glabrata* kandidemi ve kandidiyaza yol açan en önemli türlerdir. İnvaziv kandidiyazın tedavisinde ekinokandinler ve azol grubu ilaçlar önemli bir rol oynamaktadır. Ancak son yıllarda *Candida* türlerinin azol ve ekinokandin grubu ilaçlara karşı direnç kazandığı sıkça rapor edilmektedir (Spettel vd., 2019). İnvaziv fungal infeksiyonların tedavisinde kullanılan mevcut antifungallerin sınırlı oluşu, ilaç-ilaç etkileşimi, kullanılan ilaçların toksisiteleri ve ciddi yan etkileri sebebiyle tedavi oldukça güçleşmektedir. Özellikle NAC türlerde flukonazol direncinde önemli bir artış gözlenmektedir. Yapılan çalışmalarda azol direncinin farklı *Candida* türlerinde coğrafik bölgelere göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Tüm bunların yanında bazı NAC türlerinde çoklu ilaç direnci de rapor edilmektedir. Antifungal ilaç direncinin üstesinden gelebilmek ve önemli yan etkilerden sakınabilmek için bazı yeni antifungaller üzerinde de çalışmalar devam etmektedir. Amfoterisin B 30 yıldan fazla süredir klinik kullanımda olmasına rağmen bu ilaca karşı antifungal direnç minimaldir. Ancak ilacın ciddi yan etkileri ve toksisitesi kullanımını büyük ölçüde sınırlamaktadır (Spampinato ve Leonardi, 2013; Wiederhold, 2017).

2.5. Biyofilm

2.5.1. Tanımı ve yapısı

Biyofilm, mikroorganizmaların yüzeyler üzerine yapışarak oluşturdukları geri dönüşümsüz ve organize bir komunedir. Bu komunedeki hücreler ekstrasellüler bir polimer üretir ve bu da biyofilme yapısal bir destek sağlar. Yüzeyler canlı bir doku olabildiği gibi, cansız bir yüzey de olabilir. Biyofilm içindeki mikroorganizmaların düşük üreme hızları ve antimikrobiyal tedaviye çok yüksek bir direnç göstermeleri, planktonik hücrelere kıyasla oldukça farklı davranmalarına yol açar. Çeşitli medikal araçlar ya da konakçının farklı dokular üzerinde biyofilm oluşturmaları ile ısrarcı kolonizasyon ve infeksiyonlara yol açabilirler. Biyofilm tek bir mikrobiyal türle oluşturulabildiği gibi farklı türlerle de bir arada görülebilir (Zuza-Alves vd., 2017; Cavalheiro ve Tixeria, 2018)

Candida türlerinin konakçıda yüzeyel ve sistemik infeksiyonlara yol açabilmelerinde biyofilm oluşturma yetenekleri önemli bir patojenite faktörüdür. Biyofilm ilişkili infeksiyona yol açan en önemli *Candida* türleri *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*'tir. Biyofilmin karakteristiği her türün oluşturduğu EPS'ye yüzeye, karbon kaynağını kullanabilirliğine, dimorfik gelişime ve filamentasyon gibi faktörlere bağlı olarak değişir.

Bir biyofilm yapısında genel olarak %97 su, %2,5 mikroorganizma, %1-2 protein, %1-2 polisakkarit, %1-2 DNA ve iyonlar bulunmakla beraber, ilgili mikroorganizma çeşidi ve fiziksel faktörlere bağlı olarak bu oranlar değişebilmektedir (Altun ve Şener, 2008).

Biyofilm yapısı, mikroorganizmalara çeşitli avantajlar kazandırmaktadır. Örneğin mikroorganizmalar biyofilm sayesinde çevrenin zararlı etkilerinden korunmakla birlikte, yeni gen transferleri ile çeşitli fenotipik özelliklere de sahip olabilmektedirler. Diğer yandan EPS tabakası fiziksel bir bariyer oluşturarak antimikrobiyallerin dinamik biyofilm yapısı içerisine girmesini önlemektedir. Mikroorganizmalar matriks yapı içerisindeki su ve besin maddelerinin taşındığı kanal benzeri özel yapılar sayesinde ihtiyaçlarını da karşılayabilmektedir (İset, 2016).

C. albicans biyofilminin yapısal karakteristiğinin araştırılması amacıyla çeşitli *in vitro* biyofilm modelleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen verilerin *in vivo* biyofilm sonuçlarına benzer olduğu rapor edilmektedir. Biyofilmler klinik örneklerden de direkt olarak da elde edilerek çeşitli mikroskopi teknikleriyle görüntülenebilmektedir.

Bir yüzeyi kolonize edebilmek için temel şart hücrenin biyomateryale yapışmasıdır. *Candida* hücrelerinin başlangıç yapışmaları nonspesifik faktörlerle ve fungal yüzey üzerindeki spesifik adhezinlerle gerçekleşir. Burada biyofilm oluşumu hücre yüzey hidrofobisitesi ile ilişkilidir. Başlangıç yapışmasını takiben bölünme, çoğalma ve biyofilm gelişimi gerçekleşir. Olgun bir *Candida* biyofilmi heterojen ve kompleks bir yapı sergiler.

Hawser ve Douglas'ın (1994) çalışmalarında taramalı elektron mikroskop ile kateter üzerindeki biyofilm oluşumu incelendiğinde, başlangıç yapışmasının maya hücreleri ile olduğu ve bunu 3-6 saat sonra germ tüp oluşumunun izlediği gözlenmiştir. 24-48 saat inkübasyon sonrası oluşan olgun biyofilm yapısında ise yoğun bir maya, hif ve psödohif oluşumu tespit edilmiştir (Hawser ve Douglas, 1994; Ramage ve ark, 2005).

Biyofilm kaynaklı en önemli insan infeksiyonları arasında dental plaklar, yaralar üriner infeksiyonlar, prostatik kalp kapağı ve kardiyak kapak infeksiyonu ve kistik fibrozis sayılabilir.

2.5.2. Biyofilm oluşum basamakları

Yüzeye tutunma aşaması: Biyofilm oluşumunun ilk aşaması mikroorganizmaların yüzeye tutunmasıdır. Bu aşamada hücreler yüzeye yakın mesafede etkileşir, yüzeye dönüşümlü olarak tutunurlar.

Geri dönüşümsüz tutunma: İkinci aşama olan geri dönüşümsüz tutunmada hücreler zamanla ekzopolisakkarit yapıda bir materyal sentezlemeye başlar ve hücrelerin hem birbirine hem de yüzeye tutunmaları sağlanmış olur.

Kolonizasyon: Bu aşamada yüzeye tutunan hücreler bölünüp çoğalarak mikrokolonileri oluştururlar.

Olgun biyofilm oluşumu: Bu mikrokoloniler üzerine ortamdaki planktonik mikroorganizmalar da yapışarak kolonizasyon gerçekleşir ve olgun biyofilm oluşumu sağlanmış olur.

Kopma: Gelişimin kopma evresinde biyofilmin üst kısmından kopan hücreler yeni odaklarda biyofilm oluşturabilir (Altun ve Şener, 2008).

Kompleks ekzopolisakkarit materyal fagositik hücrelere karşı savunma, biyolojik film bütünlüğünü korumak için iskelet görevi görme, toksik maddelerin biyofilme difüzyonunu sınırlandırma işlevlerini görmektedir (Blankenship ve Mitchell, 2006). Ayrıca biyofilm tabakası (EPS) bakterileri besinsizlikten, kuraklıktan, pH dalgalanmalarından, ozmotik stresten, faj atıklarından ve antibiyotiklerden korur (Akan ve Kınık, 2014).

2.5.3. Biyofilm direnç mekanizmaları

Çeşitli antimikrobiyal bileşenlere karşı mikroorganizmaların geliştirdiği biyofilm direnç mekanizmaları henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak çeşitli model sistemler üzerinde bu direncin nasıl gerçekleşmiş olabileceğine dair rapor edilen veriler aşağıda kısaca özetlenmiştir.

2.5.3.1. Antimikrobiyalın biyofilme penetrasyonunun engellenmesi

Biyofilm içerisindeki hücrelerin EPS matriksi içine gömülmesi, antimikrobiyalın biyofilme difüzyonunu kısıtlamaktadır. Ancak yapılan son çalışmalarda EPS'nin tamamen geçirgen olmayan bir bariyer oluşturmadığı ve ortamda bulunan diğer mekanizmaların da dikkate alınması gerektiğini ortaya koymaktadır (Mah ve O'Toole; 2001).

2.5.3.2. Yavaş üreme ve stres cevabı

Mikroorganizmaların hızlı üreme fazından yavaş ya da hiç ürememe fazına geçmesi durumunda, antibiyotik dirençlerinin arttığı bildirilmektedir. Olgun biyofilm yapısında mikroorganizmalarda yavaş üreme görülür. Bu ortamda besin sınırlaması da olduğundan fizyolojik bir değişim de görülmektedir (Brown vd., 1988; Mah ve O'Toole; 2001).

2.5.3.3.Heterojenite

Biyofilm yapısında besinler, atık ürünler, sinyal faktörleri ve farklı oranlarda büyüyen hücreler ile birlikte heterojen bir çevre oluşturmaktadır. Ayrıca belirli hücrelerin lokasyonuna bağlı olarak antimikrobiyal aktivitede farklılık gösterebilmektedir (Mah ve O'Toole; 2001).

2.5.3.4.İsrarcılık (persestence) fenomeni

Biyofilm yapısında ısrarcı hücreler olarak adlandırılan küçük bir alt popülasyon bulunmaktadır. Bu hücrelerin üreme oranları sıfırdır ya da aşırı derecede yavaştır. Klinikte kullanılan mevcut ürünlerin çoğu hücre gelişimi ve bölünmesini hedeflediğinden ısrarcı hücrelere karşı etkili değildir. Bu sebeple ısrarcı hücreler bir nevi hastalık rezervuarıdır ve ilaç stresi ortadan kalktıktan sonra infeksiyöz partikülleri yeniden aktive edebilirler.

2.5.3.5.Genetik adaptasyon

Bir biyofilm içinde gerçekleşen genetik adaptasyon ile ilaç duyarlılığı azaltılmakta; farklı ve korunmuş bir fenotip ile uyum sağlanmış olmaktadır.

2.5.3.6.Metabolik aktivite

Mikroorganizmaların metabolik aktivitesi, biyofilm içindeki oksijen varlığı ve besinsel farklılıklardan etkilenmektedir. Örneğin biyofilmin alt kısımlarına gidildikçe besin difüzyonu zayıfladığından metabolik potansiyel sınırlıdır ve hücreler daha yavaş gelişmektedir.

2.5.3.7.Atım Pompaları

Biyofilm yapısında atım pompalarının artması ve dolayısıyla hücre içine ilaç birikiminin azaltılması ilaç direncini etkilemektedir. Özellikle *Candida* türleri üzerinde bu konuda pek çok *in vitro* çalışma yapılmış ve biyofilm ilaç direncinin artan atım pompası ile ilgili olduğu rapor edilmiştir (Ramage vd., 2012; Taff vd., 2013).

2.6. Quorum Sensing Sistemi ve Farnesol

2.6.1. Quorum sensing sistemi

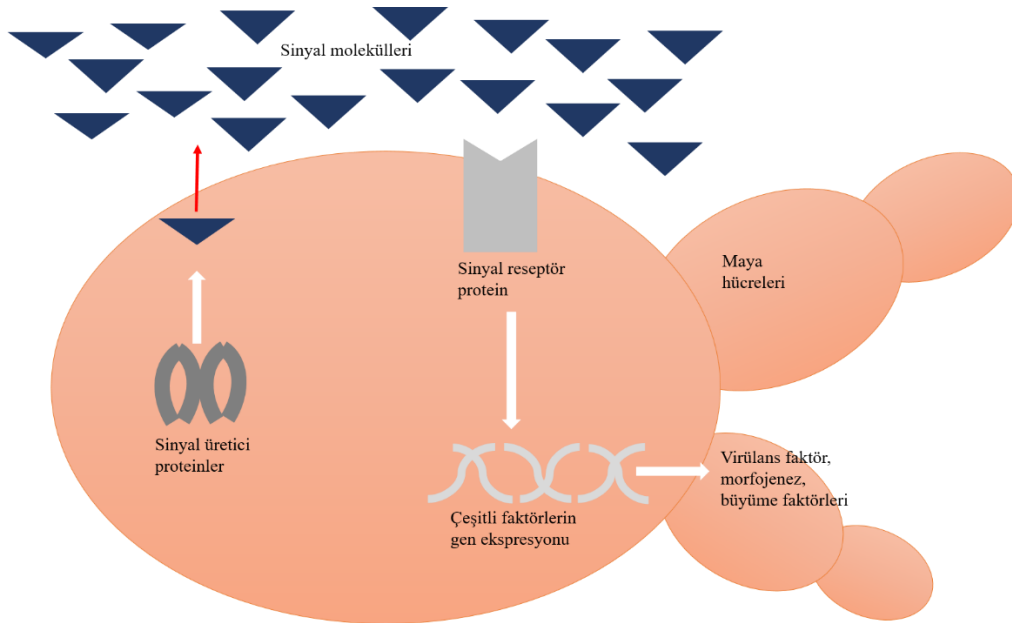
İletişim yaşamın en temel proseslerinden biridir ve bir popülasyondaki bireylerin davranışlarını koordine etmek için mutlaka gereklidir. En ilkel yapıları hücre hücre organizma popülasyonlarında bile, çeşitli salgı molekülleri yoluyla hücre-hücre iletişimini sağlayan koordine bir davranış sistemi görülmektedir (Polke vd., 2017). Çoğunluğu algılama sistemiyle oluşturulan bu sistemde, mikroorganizmalar ürettikleri sinyal molekülleri sayesinde birbirleri ile haberleşebilmekte ve belirli bir yoğunluğa ulaştıklarında virülans faktörlerine ait çeşitli genlerin ekspresyonlarını tetikleyebilmektedirler. Bu da, konakçının bağışıklığını uyardırmadan gizli kalabilmelerini ve sonrasında da enfeksiyonun başlamasına yol açmaktadır (Alem vd., 2006; Özkütük, 2007).

Mikroorganizmalar hayatta kalabilmek için çevrelerindeki diğer türlerle rekabet halindedirler ve farklı hayatta kalma stratejileri geliştirerek kendilerine alan, besin ya da ekolojik niş sağlamaya çalışırlar. Genel stres cevabı, enerji metabolizması, atım pompaları ya da QS gibi mekanizmalar bunlara örnek olarak verilebilir. QS, mikroorganizmalar arasında biyofilm oluşumu, virülans faktör ekspresyonu, sekonder metabolit üretimi ve stres adaptasyon mekanizmaları gibi özel süreçleri kontrol edebilen bir iletişim mekanizmasıdır. Genel olarak QS molekülleri ekstrasellüler olarak birikir ve özgün reseptörlerle algılanırlar. Kritik bir eşik değere ulaştıklarında ise planlanmış cevap ortaya çıkar (Saraçlı, 2006). Bu sistemde salgılanan QS molekülleri ya da otoindükleyiciler, ortamda birikirler ve belli bir seviyeye ulaştıklarında spesifik cevaplara aracılık ederler (Williams vd., 2007; Polke vd., 2017). Şimdiye kadar birçok QS molekülü tespit edilmiş olup bunların en önemlileri Açık Homoserin Lakton (AHL), Otoindükleyici Peptitler (AIP) ve Otoindükleyici-2 (AI-2)'dir. Her sınıfın içerisinde yan zincirlerin uzunlukları farklı olabilir ve bazı mikroorganizmalar birden fazla QS molekülü kullanabilir.

AHL tipi iletişim, genellikle gram (-) bakterilerde görülür. Biyoluminesanstan sorumlu genler iki operonda düzenlenen yedi farklı gen ile kontrol edilmektedir. AIP tipi iletişimde, gram (+) bakteriler otoindükleyici denilen peptitler salgırlar. Bu moleküllerin çoğu translasyon sonrası değişime uğrayan büyük peptitlerden üretilmektedir. AIP, hücre

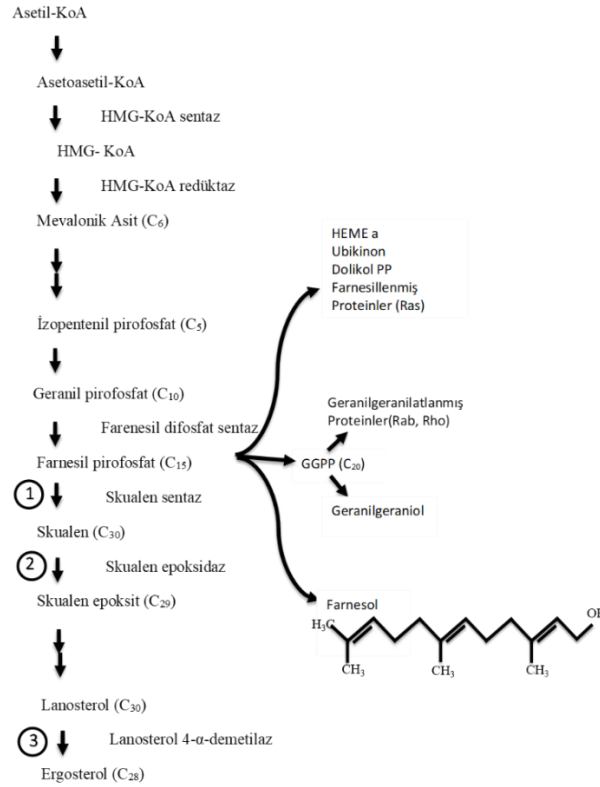
zarında bulunan ABC transporter sistemi tarafından eksprese edilmektedir. AI-2 tipi iletişim gram (-) ve gram (+) birçok bakteride gözlenmiştir. Bu sistemler de AHL gibi biyoluminesans genlerini kontrol eder.

Mantarlardaki QS çalışmaları ise bakterilere göre çok daha yenidir ve farnesol, ökaryotlarda keşfedilen ilk QS sinyal molekülüdür. 2001 yılında tanımlanan farnesol molekülünün *C. albicans* hücre morfolojisini kontrol edebildiği rapor edilmiştir (Hornby vd., 2001). Bu çalışmada L-prolin, N-asetilglukozamin, domuz ve sığır serumları varlığında farnesolün germ tüp oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Gerçekte farnesol orijinal olarak aromatik bitkilerden izole edilmiştir. Aynı zamanda insanlarda da mevolanat/kolestrol biyosentezi yolağında bir aracı olarak üretilmektedir. Ancak fungal cinsler içerisinde tanımlanan ilk QS molekülü olarak çok önemlidir ve mekanizmaları araştırılmaya devam edilmektedir (Polke vd., 2017). *C. albicans* farnesolün yanı sıra tyrosol gibi farklı sinyal molekülleri de üretmektedir. Mantarlarda quorum sensing Şekil 2.2.'de özetlenmiştir (Sharma ve Jangid, 2017):



Şekil 2.2. Mantarlarda Quorum Sensing (Sharma ve Jangid, 2017)

2.6.2. Farnesol



Şekil 2.3. Farnesil Difosfatın (FPP) Enzimatik Defosforilasyonu (Nickerson vd., 2006)

Farnesol *C. albicans*'ta, Farnesol Pirofosfatın (FPP) defosforilasyonu ile sterol sentetik yolağının (Şekil 2.2) bir yan ürünü olarak üretilmektedir. Nickerson vd. (2006), sterol sentetik yolağında FPP'nin yaklaşık %1,6'sının direkt olarak farnesol üretiminde kullanıldığını rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda subinhibitör konsantrasyonlarda zaragozik asit ya da flukonazol kullanarak yolaktaki FPP birikiminin artması ile farnesol seviyesinin 8-10 kat artışı sağlanmış ve farnesolün bu birikiminin antifungal etkiye katkıda bulunabileceği rapor edilmiştir (Hornby vd., 2003; Hornby ve Nickerson, 2004; Polke vd., 2017).

Sitoplazmik ve nükleer membranda yerleşik olan farnesol çok geniş etkilere sahip olan bir sinyal molekülüdür fakat bunların en önemlisi gelişim hızını etkilemeksizin *Candida* hücre morfolojisini değiştirebilme yeteneğidir. Örneğin farnesol, yüksek konsantrasyonlarda hif oluşumunu baskılamakta ancak önceden oluşan hifin uzamasını engelleyememektedir.

Diğer yandan farnesolün, ilaç direnci, patojenite, hücre duvarının korunması, yüzey hidrofobisitesi ya da fagositik cevap gibi çeşitli fenotipik durumlarda ilgili gen ekspresyonlarını tetikleyebildiği de rapor edilmektedir. Farnesolün hücre biyolojisi üzerine bu farklı etkileri göz önüne alındığında birden fazla sinyal yolağını etkileyebildiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak farnesolün bu konudaki moleküler mekanizmaları halen tam olarak açıklanamamıştır.

Konuyla ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde Ramage vd. (2005), farnesolün biyofilm gelişimi üzerindeki etkisinin zamana bağlı olduğunu tespit etmişler ve sıfırıncı zamanda 30 µM-300 µM farnesol ilavesi ile biyofilm gelişiminin inhibe edildiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar 1-2 saat sonra farnesol ilave edildiğinde ise biyofilm gelişiminin devam ettiğini belirtmişlerdir. Buradan yola çıkılarak, hifal formasyon başladıktan sonra farnesol ilave edilmesinin biyofilm gelişimini inhibe edemediği rapor edilmiştir. İlginç bir şekilde, 24. saatte ise olgun biyofilm tekrar farnesole duyarlı hale gelmiştir (Ramage vd., 2005).

Leonhardt vd. (2015), *C. albicans*'ın 3 farklı otoregülatör bileşen ürettiğini rapor etmişlerdir ve bu bileşenler tirozol, farnesoik asit ve farnesoldür. Araştırmacılar, *C. albicans*'ın 55 µM konsantrasyon seviyesine kadar sürekli olarak farnesol salgılamaya devam ettiğini bildirmişlerdir. Ancak, lokal mikroçevrelerde bu oran çok daha yüksek konsantrasyonlara ulaşabilir. Farnesol, *Candida dubliniensis* gibi *C. albicans* ile yakından ilişkili diğer türler tarafından da üretilmektedir. Farnesolün, *C. albicans*'ta maya hif geçişini kontrol edebilmesi, aynı zamanda biyofilm inhibisyonu ile de ilgili bir durumdur. Diğer yandan, farnesolün *C. albicans*'ı oksidatif strese karşı koruduğu da bilinmektedir (Leonhardt vd., 2015).

Farnesolün *C. albicans* üzerindeki etkilerinin yanı sıra, bu QS molekülünün diğer mikrobiyal türler ve konak hücreler üzerinde etki gösterdiği gösterilmiştir. *C. albicans* ve *Pseudomonas aeruginosa* karma popülasyonunda, Farnesol, *P. aeruginosa*'daki kinolon sinyalinin azalmasına yol açar ve sonuç olarak bu iki türün bir arada bulunmasına ortam sağlar. Ayrıca farnesol, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'nin ekzojen kimyasal bileşiklere geçirgenliğini artırır, mantar patojenleri *Aspergillus nidulans* ve *A. flavus*'ta da apoptozu indüklemektedir (Leonhardt vd., 2015). Martins vd. (2007), farnesolün

klamidospor gelişimini de etkilediğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, besiyeri içerisinde farnesol konsantrasyonunu arttırdıklarında klamidospor sayısı çok artmıştır (Martins vd., 2007).

Weber vd. (2010), *C. tropicalis* 'in biyofilm oluşumunda farnesolün rolünü araştırdıkları çalışmalarında, farnesolün hem hücrel agregatları inhibe ettiğini hem de *C. tropicalis* olgun biyofilm hücrelerini etkilediğini belirtmişlerdir. Bu da farnesolün, biyofilm hücrelerinin diğer vücut bölgelerine yayılması ile ilişkili bir durum olabilir (Zuza-Alves vd., 2017)

2.7. Biyofilm Oluşumunun Kontrolü ve Engellenmesi

Biyofilm oluşumu artan morbidite ve mortalite oranları ve ciddi mali yük oluşturması sebebiyle sağlık alanında büyük bir önem taşımaktadır. Biyofilmler geleneksel antimikrobiyal tedavilere çok yüksek derecede dirençli olup ısrarcı infeksiyonlara yol açarlar. Biyofilm gelişerek olgunlaştıktan sonra ortadan kaldırmak çok zordur. Bu yüzden biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesi üzerine çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Biyofilm oluşumunu kontrol etmek ya da biyofilm gelişiminin farklı safhalarını hedeflemek için üzerinde durulan üç temel strateji bulunmaktadır:

1. Mikroorganizmanın yüzey üzerine yapışmasının engellenmesi,
2. Oluşan biyofilmin çeşitli yaklaşımlarla tahrip edilmesi,
3. QS sistemine müdahale ederek mikrobiyal iletişimin engellenmesi.

Bu stratejilere yönelik yapılan genel uygulamalar Çizelge.2.1'de özetlenmiştir (Subhadra vd., 2018):

Çizelge 2.1. Biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesi (Subhadra vd., 2018)

Strateji	Yöntemler	Örnekler
Başlangıç biyofilm yapışmasının inhibisyonu	(i)Biyomateryallerin kimyasal özelliklerinin değiştirilmesi	(i)Antibiyotikler, biyositler, demir kaplama
	(ii)Biyomateryallerin fiziksel özelliklerinin değiştirilmesi	(ii)Hidrofilik polimerlerin kullanımı, süperhidrofobik kaplama, hidrojel kaplama, heparin kaplama
Biyofilmin uzaklaştırılması	(i)Matriks parçalayıcı enzimler	(i)Polisakkarit parçalayıcı enzimler (Dispersin B, Endolizinler); Nükleazlar (Deoksiribonükleaz I) ve proteazlar (Proteinaz K, tripsin)
	(ii) Yüzey aktif maddeler (surfaktanlar)	(ii)Sodyum dodesil sülfat(SDS), Setiltrimetilamonyum bromid (CTAB), Tween 20 ve Triton X-100, sürfaktin, ramnolipitler
	(iii)Serbest yağ asitleri, amino asitler, nitrik oksit vericiler	(iii) <i>Cis</i> -2-dekanoik asit, D-aminoasitler, sodyum nitroprussid(SNP), S- nitroso-L-glutasyon (GSNO) ve S-nitroso-N-asetilpenisilamin (SNAP) gibi nitrik oksit üreticileri
Quorum quenching ile biyofilm inhibisyonu	(i)QS sinyallerinin parçalanması	(i)Laktonazlar, açılazlar ve oksidoredüktazlar
	(ii)Sinyal oluşumlarının inhibisyonu	(ii)S-adenosil-metionin (SAM), S-adenosil-homosistein (SAH), sinefugin, butiril-SAM; SAM Siklölösün biyosentezi inhibitörü, 5-metiltiyoadenozin (MTA) gibi öncü AHL analoglarının kullanımı, nikel ve kadmiyum gibi AHL sentez inhibitörleri
	(iii) Sinyal moleküllerinin artırılması	(iii) AHL analogları (bergamottin, dihidroksibergamottin, siklik sülfür bileşenleri, baicalin hidrat ve epigallokatechin içeren fenolic bileşenler; AI-2 analogları (ursolik asit, izobütil-4,5-dihidroksi-2,3-pentandion (izobütil-DPD) ve fenil-DPD); AIP analogları (siklo (L-Phe-L-Pro) ve siklo(L-Tyr-L-Pro) gibi siklik peptitleri, RNAIII inhibisyon peptitleri (RIP) ve homologları
	(iv)Sinyal transdüksiyon inhibisyonu	(iv) Halojenlenmiş furanon, fimbrolid, sinmaldehit ve virstatin kullanımı
	(v)Sinyal taşıyıcıların inhibisyonu	(v) Bakır ya da gümüş nanopartiküllerin kullanımı, Phe-Arg-β-naftilamid (PAβN)

Literatür çalışmalarına göre farnesol hem bir QS molekülü hem de *C. albicans*'ın virülans faktörü olarak büyük ilgi çekmektedir. Pek çok mikroorganizma üzerine inhibitör etkilidir ve antibiyofilm potansiyeli sebebiyle oldukça umut vericidir. Ancak farnesolün antibiyofilm etkinliği ve özellikle farklı *Candida* türleri üzerine etkileri hakkında çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Araştırmamızda çeşitli *Candida* türleri üzerine farnesolün farklı konsanstrasyon ve sürelerdeki etkilerinin, biyofilm oluşumu öncesi ve sonrası detaylı biçimde incelenmesi hedeflenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan organizmalar

Çalışmamızda kullanılan klinik izolatlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan elde edilmiştir. Bu izolatlar 6 farklı türe ait olup, *C. albicans* 1766, *C. krusei* 1561, *C. tropicalis* 1678, *C. glabrata* 1744, *C. kefyr* 1798 ve *C. parapsilosis* 1799 olacak şekilde kan ve periton sıvısı örneklerinden izole edilmişlerdir. İdentifikasyon işlemleri için germ tüp testi, Mısır unlu Tween 80 agarda mikroskopik morfoloji, CO₂ fermentasyon testlerini içeren geleneksel metodlar ve API 20C (bioMerieux, Marcy l'Etoile-France) ile ticari asimilasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda ayrıca *C. albicans* ATCC 14053 izolatı standart mikroorganizma olarak kullanılmıştır. İzolatlar %20 gliserol içeren Yeast Ekstrat Pepton Dekstroz (YPD) içerisinde -80 °C'de saklanmışlardır. Taze kültür hazırlama amacıyla stoktan alınan izolatlar RPMI 1640 besiyeri içerisinde ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (CLSI M27-A2).

3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar

Çalışmamızda kullanılan izolatların aktive edilmesi için RPMI 1640 besiyeri; antimikrobiyal aktivite tayini için *MOPS* ile tamponlanmış RPMI 1640 Broth ve elektron mikroskopik görüntüleme için örnek hazırlama proseslerinde Triptic Soy Broth besiyerleri kullanılmıştır.

RPMI 1640 besiyeri: Çalışmamızda kullanılan RPMI 1640 besiyeri (L-glutamin ve sodyum bikarbonatlı), ticari olarak hazır şekilde Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Yeast Extract Pepton Dekstroz (YPD) besiyeri: İçeriğinde bakteriyolojik pepton 20 (g/L), Yeast ekstrat 10 (g/L), Glukoz 20 (g/L) bulunan ticari besiyeri (Sigma-Aldrich

Chemie GmbH, Almanya) 50 (g/L) olacak şekilde distile su içerisinde çözdürülerek otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilize edilmiştir.

Tryptic Soy Agar (TSA) besiyeri: İçeriğinde kazein pepton 15 (g/L), NaCl (Sodyum klorür) 5 (g/L) soya pepton 5 (g/L) agar-agar 15 (g/L) bulunan ticari besiyeri (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Almanya) 40 (g/L) olacak şekilde distile su içerisinde çözdürülerek otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilize edilmiştir.

Tryptic Soy Broth (TSB) besiyeri: İçeriğinde kazein pepton 17 (g/L), K₂HPO₄ (Potasyum dihidrojen fosfat) 2,5 (g/L), glukoz 2,5 (g/L), NaCl 5 (g/L) soya pepton 3 (g/L) bulunan ticari besiyeri (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Almanya) 30 (g/L) olacak şekilde distile su içerisinde çözdürülerek otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilize edilmiştir.

Farnesol temini: Çalışmamızda kullanılan Farnesol (3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol) %95 saflıkta ve ticari olarak hazır şekilde Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir (Molekül ağırlığı: 222,37 g).

XTT ve Menadione Temini: Çalışmamızda kullanılan XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) ve Menadione ticari olarak hazır şekilde Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Elektron mikroskopik incelemelerde kullanılan kimyasallar

Fosfat tampon tuz çözeltisi (PBS): 200 ml distile su içerisinde 1 tablet PBS(Sigma-Aldrich, ABD) çözdürülerek hazırlanır. pH 7,4 olmalıdır.

Primer fiksatif (%2,5'luk Gluteraldehit tespit solüsyonu): Hazırlanan PBS tamponundan 20 ml, %2,5'luk gluteraldehitten (EMS, ABD) 3 ml alınarak primer fiksatif çözeltisi elde edilir. Çözelti koyu renkli bir şişede ve +4 C'de muhafaza edilir. pH 7,2 olmalıdır.

Sekonder fiksatif (%1'lik Osmiyum Tetraoksit tespit solüsyonu): 0,1 g OsO₄ (Osmiyum Tetraoksit) (EMS, ABD) koyu renkli bir şişeye alınıp önce deterjan ve sonra

distile sudan geçirilerek yıkanmıştır. 5 ml distile su, koyu renkli bir şişe içerisine alınmış ve içine osmiyum ampülü hızlıca kırılarak eklenmiştir. Şişenin ağzı kapatılarak parafilmlelenmiştir. Bir gece +4 °C’de bekletilmesinin ardından içine 5 ml PBS tamponu eklenmiştir. Solüsyon kullanılabilecek buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Gömme ortamı (Araldit Resin): 20 ml Araldit CY212 ve 20 ml DDSA(sertleştirici) bir erlen içerisinde 20 dk boyunca cam bağıtle yavaş bir şekilde kabarcık yapmadan karıştırılmıştır. 1 ml dibütil fitalat (plastik yapıcı) eklenerek 15 dk daha karıştırmaya devam edilmiştir. Son olarak 0,6 ml BDMA (katalizör) ilave edilerek karışım enjektörlere paylaştırılmış ve kullanım zamanına kadar dondurucuda stoklanmıştır.

Uranil Asetat boyası: 7 g uranil asetat 50 ml metanol ve 50 ml distile su karışımı hazırlanarak kullanım zamanına kadar +4 °C’de stoklanmıştır. Boya kullanılacağı zaman oda ısısına getirilerek ve filtre edilerek kullanılmıştır.

Kurşun boyası: 2 g 10 N NaOH (Sodyum hidroksit) ve 5 ml distile su karıştırılarak A karışımı; 0,02 g Kurşun Sitrata ve 10 ml distile su karıştırılarak B karışımı elde edilir.

Boya hazırlanırken B karışımı iyice çözdürülmüştür. İçerisine damla damla 1 N NaOH ilave edilerek pH 12 olacak şekilde boya hazırlanmıştır. Kullanım zamanına kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Boya kullanılacağı zaman oda ısısına getirilerek ve filtre edilerek kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Farnesol muamelesi ile *Candida* türlerinde *in vitro* üreme takibi

Çalışmada RPMI 1640 besiyerinde ve 37 °C’de 24 saat inkübe edilen maya izolatları, 5 ml %0,85 serum fizyolojik içine alınmışlardır. Daha sonra 0,5 McFarland (1-5x10⁶ hücre/ml) olacak şekilde dansitometre (Biosan McFarland dansitometre, Letonya) ile ayarlanmıştır (Clinical Laboratory Standards Institute–CLSI M27-A2).

In vitro gelişim takibi testi için 0,5 McFarland olacak şekilde hazırlanan maya hücreleri, 600-1,171 μM konsantrasyon aralıklarında seyreltilmiş farnesol içeren RPMI 1640 besiyeri içerisine inokule edilmişlerdir. 96 kuyucuklu U tabanlı mikropklarda yapılan çalışmada her kuyucuk için final hacmi 200 μl olacak şekilde ayarlanmıştır. Farnesol içermeyen kontrol grubu da çalışmaya dahil edilmiştir. Mikropklaklar 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra elde edilen hücre yoğunlukları, 490-600 nm’deki optik dansite (OD) absorpsiyonunun ölçülmesi ile tayin edilmiştir. Farnesolün *Candida* hücreleri üzerinde gösterdiği OD değerlerine karşılık gelen yüzdesel gelişim oranları, sütun grafikleri şeklinde hazırlanmıştır. Tüm deneyler 2 kez tekrarlanmıştır (Derengowski vd., 2009).

3.2.2. Biyofilm oluşumu üzerine farnesolün etkisinin XTT indirgeme testi ile tayini

Candida hücre süspansiyonları 0,5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ hücre/ml) olacak şekilde hazırlandıktan sonra, RPMI 1640 besiyeri ve 600-1,171 μM konsantrasyon aralıklarında seyreltilmiş farnesol içeren 96 kuyucuklu ve steril düz tabanlı polistiren mikropklaklara eklendi. Farnesol içermeyen kontrol grubu da çalışmaya eklenmiştir. Böylece farnesolün inkübasyon öncesi (0. Saat) biyofilm oluşumuna etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. 37 °C’de 72 saat inkübasyon sonrası besi yeri aspire edilmiş ve kuyucuklar PBS ile mikropklak yıkayıcıda (Combiwash Human Diagnostic Worldwide, Almanya) yıkanarak yapışmayan hücrelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Biyofilm oluşumunun yarı kantitatif ölçümü XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide) indirgeme testi ile gerçekleştirildi (Ramage vd., 2002). Bu amaçla XTT (Sigma-Aldrich, ABD) 1 mg/ml konsantrasyonda Ringer’s Lactate solüsyonunda tamamen çözünmesi sağlandı. Daha sonra çözelti 0,22 μm gözenekli filtreden geçirildi. Menadione (Sigma-Aldrich, ABD) ise 10 mM konsantrasyon olacak şekilde asetonda çözdürüldü ve 1:10 PBS ile seyreltildi. 5 mg/ml XTT içeren XTT-Menadione çözeltisinde son konsantrasyon 1 μM olacak şekilde menadion eklendi.

Daha önceden yıkanmış ve kurutulmuş olan kuyucuklara 50 μl XTT-menadione eklendi. Plaklar 2 saat 37 °C’de karanlıkta inkübe edildi. Biyofilmin metabolik aktivitesinin bir yansıması olarak 490-630 nm’deki kolorimetrik değişimler bir mikropklak okuyucu

(Chromate Microplate Reader Model 4300, Awareness Technology Inc. Doc) ile ölçüldü (Ramage vd., 2002).

3.2.3. Oluşmuş biyofilm üzerine farnesolün etkisinin XTT indirgeme testi ile tayini

Bu çalışmada yukarıdaki protokol kullanılarak *Candida* biyofilmleri düz tabanlı mikropatlarda 24 saat 37 °C’de geliştirildi. Biyofilm oluşumunu takiben besiyeri aspire edildi ve yapışmayan hücreler PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı. RPMI 1640 içerisinde hazırlanan 600-1,171 µM konsantrasyon aralıklarında seyreltilmiş farnesol eklendi. Mikropatlaklar 37 °C’de 72 saat inkübe edildi. Önceden oluşmuş biyofilm üzerine farnesolün etkileri yukarıda belirtilen şekilde XTT indirgeme testi ile tayin edildi.

3.2.4. Farnesolün planktonik *Candida* hücreleri üzerine etkisinin geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmesi

Farnesolün planktonik *Candida* hücreleri üzerine morfolojik etkilerini inceleyebilmek için geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılmıştır. Bu amaçla *C. albicans* ATCC 14053 izolatu kullanılmış ve steril 6 kuyulu plaklar kullanılmıştır.

Çalışılacak *C. albicans* ATCC 14053 izolatu 0,5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ hücre/ml) olacak şekilde süspansiyon haline getirilmiştir. RPMI 1640 Broth besiyeri her bir kuyuya 4 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Farnesol 600–37,5 µM konsantrasyon aralıklarında seyreltilmiş olarak hazırlandı ve 4'er ml olacak şekilde kuyulara eklendi. Konsantrasyon aralıklarının belirlenmesinde Yöntem 3.4 bölümünde verilen ilk 5 konsantrasyon çalışmaya alınmıştır. Bu aralık, bulgular kısmında Şekil 4.2’de *C. albicans* ATCC 14053 izolatu için elde ettiğimiz etkin konsantrasyona dayanarak belirlenmiştir. Son olarak mikroorganizma süspansiyonları da 200 µl olacak şekilde kuyulara inoküle edildi. Çalışmaya farnesol içermeyen kontrol grubu da dahil edildi. 37 °C’de 24 saat inkübasyon sonrası bırakıldı. 24 saat sonunda her bir konsantrasyon için 490-600 nm’de absorbans ölçümleri yapıldı. Analiz sonunda en düşük konsantrasyon değerindeki süspansiyon ve kontrol grubu çalışmaya alındı.

Bu amaçla kontrol ve deney grubuna ait olarak hazırlanan *C. albicans* ATCC 14053 hücre süspansiyonları steril plastik santrifüj tüplerine alınarak 15 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen hücre pelleti 3 kez ard arda PBS ile 10'ar dk yıkanmıştır. Süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından çöken pellet, primer fiksatif içerisinde 24 saat +4 °C'de bekletilmiştir. Ertesi gün PBS ile 3 kere yıkanarak primer fiksatiften uzaklaştırılan hücreler, sonrasında osmiyum tetraoksit çözeltisi ile 1 saat boyunca ışık almayan ortamda ve rotator yardımıyla sekonder fiksasyona alınmıştır. Tekrar PBS ile 3 kez yıkama yapıldıktan sonra hücreler %5 agar içerisine gömülmüş ve ardından %1 uranil asetat ile blok boyama yapılmıştır. Daha sonra bloklar %40, %60, %75 ve %95 lik etil alkol serilerinde +4 °C'de dehidrasyona bırakılmıştır. %100 lük son etanol banyosu oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Şeffaflaştırma ve gömme işlemleri sonrası bloklar 60 °C'de 48 saat polimerizasyona bırakılmıştır. Bir ultramikrotom (Leica UltraCutR) ile hazırlanan örneklerin 60 nm kalınlığındaki kesitleri elde edilerek bakır gridler üzerine alınmıştır. Örnekler ilk olarak 15 dk uranil asetat ile sonrasında da 1 dk kurşun boyası ile boyanarak kurutulmaya bırakılmıştır. Örnekler ESOGU ARUM' da bulunan Hitachi HT7800 TEM ile incelenmeye alınmıştır.

3.2.5. Farklı biyomateryaller üzerinde farnesolün *Candida* biyofilmine etkilerinin SEM ile incelenmesi

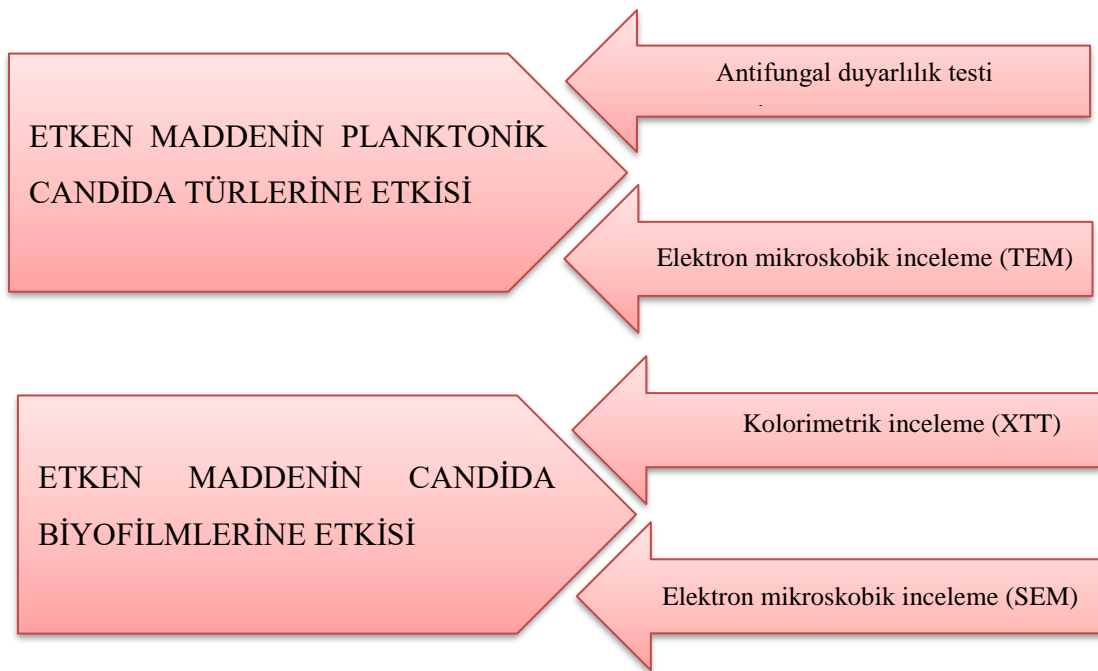
Çalışmamızda, *C. albicans* ATCC 14053, *C. albicans* 1766 izolatlarının steril silikon (Chilecom Medical Devices Co. Ltd.) ve polivinil klorid (Bıçakçılar Tıbbi Cihazlar Sanayi ve Ticaret A.Ş.) biyomateryal yüzeyleri üzerinde 24 kuyulu plaklar içerisinde biyofilm oluşum ve gelişim yeteneklerine farnesolün etkisi SEM ile görüntülenmiştir. RPMI 1640 Broth besiyeri her bir kuyuya 1 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Çalışılacak *Candida* izolatları 0,5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ hücre/ml) olacak şekilde süspansiyon haline getirilerek besiyeri ve biyomateryalin bulunduğu kuyulara 50 µl eklenmiştir. Farnesolün farklı zamanlarda ilavesinin incelemesi amacıyla 1 ml 300 µM farnesol, 0. saat, 6. saat ve 24. saatte ortama eklenmiştir. 0. saatte farnesol ilavesinin etkisini incelemek amacıyla inkübasyon 6. ve 24. saatlerde durdurularak primer fiksatif içerisinde 24 saat +4 C'de bekletilmiştir. Ardından materyaller, primer fiksatifin ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla 3 kez 15'er dk PBS ile yıkanmıştır. 6. saatte ve 24. saatte farnesol ilavesinin etkisini incelemek amacıyla farnesol ilavesinden 24 saat geçmesinin ardından inkübasyon durdurularak materyaller +4

C'de 24 saat primer fiksatif içerisinde bırakılmıştır. Materyaller 3 defa 15'er dk PBS ile yıkanarak fiksatiften uzaklaştırılmıştır. Ayrıca farnesolün bulunmadığı kontrol grubunun 0.saat, 6. saat ve 24. saat örneklerine de primer fiksatif içerisinde bekletme ve tampon çözeltisi ile yıkama işlemleri aynı şekilde yapılmıştır. Tüm bu işlemlerden sonra örnekler giderek artan konsantrasyonlarda etil alkol yardımıyla (%50, %70, %90, %95 ve %100) dehidre edilerek kurutulmuştur. Ardından örnekler SEM numune kaplama cihazı (Polaron SC7620 Sputter Coater) ile altın-paladyum kaplanmıştır. Analiz için örnekler ESOGÜ ARUM' da bulunan HİTACHI Regulus 8230 SEM cihazı ile incelenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Çalışmamızda farnesolün planktonik hücreler üzerine etkisi hem mikrodilüsyon yöntemi ile hem de TEM ile araştırılmıştır. Etken maddenin biyofilm üzerine etkisi ise kolorimetrik (XTT) ve SEM yöntemleri ile incelenmiştir (Şekil 4.1).



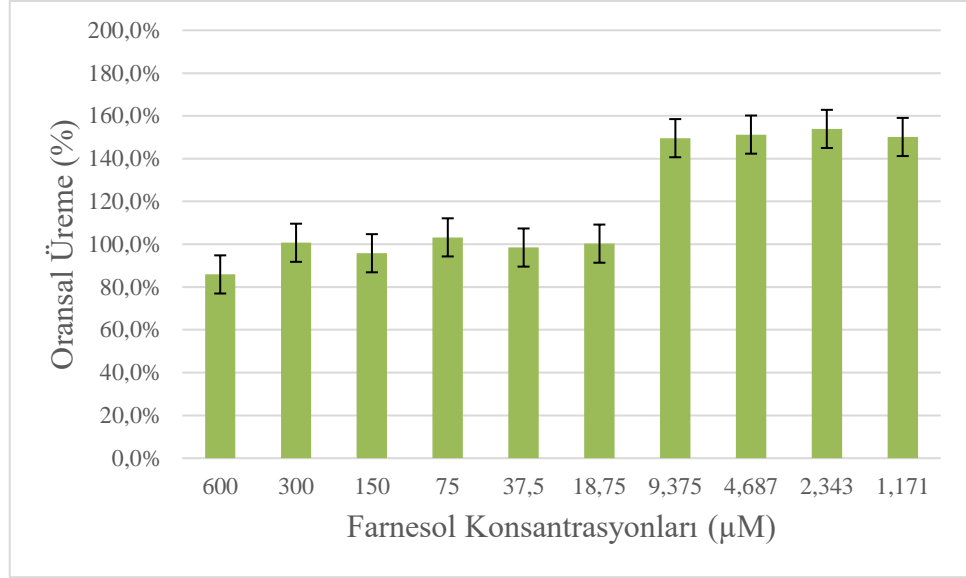
Şekil 4.1. Araştırmada kullanılan çalışma basamakları

4.1.1. Farnesol muamelesi ile *Candida* türlerinde *in vitro* üreme takibine dayalı sonuçlar

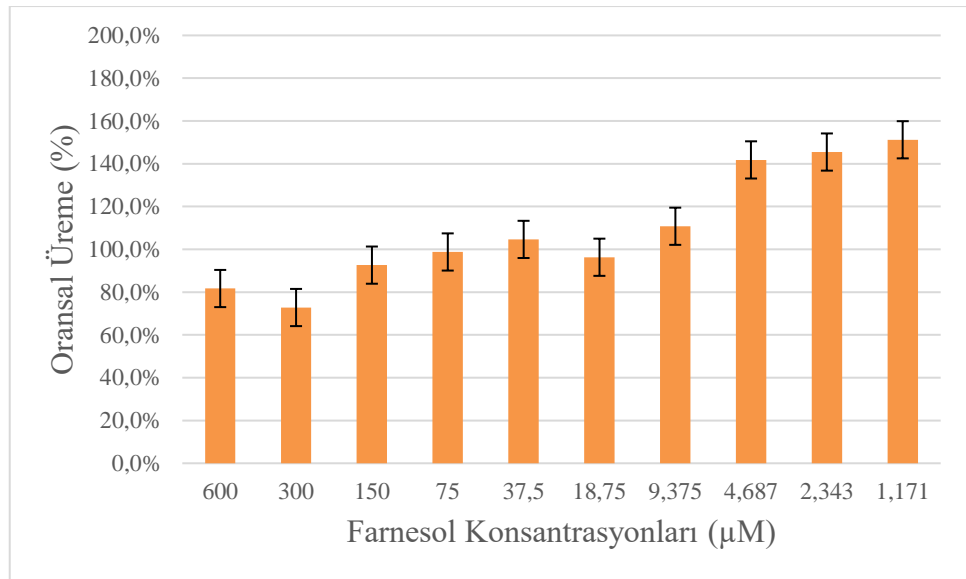
Farnesolün planktonik *Candida* hücreleri üzerindeki etkin konsantrasyonunu belirlemek amacıyla yapılan mikrodilüsyon çalışmalarında elde edilen sonuçlar, aşağıda 7 ayrı şekilde gösterilmiştir (Şekil 4.2-4.8). Tüm çizelgelerde farnesol içermeyen kontrol grubunun gelişimi %100 kabul edilmiştir. Elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

C. albicans ATCC 14053, *C. tropicalis* 1678 ve *C. glabrata* 1744 izolatları 600 µM-37,5 µM (Şekil 4.2, Şekil 4.4 ve Şekil 4.8); *C. albicans* 1766 ve *C. kefyr* 1798 izolatları 600

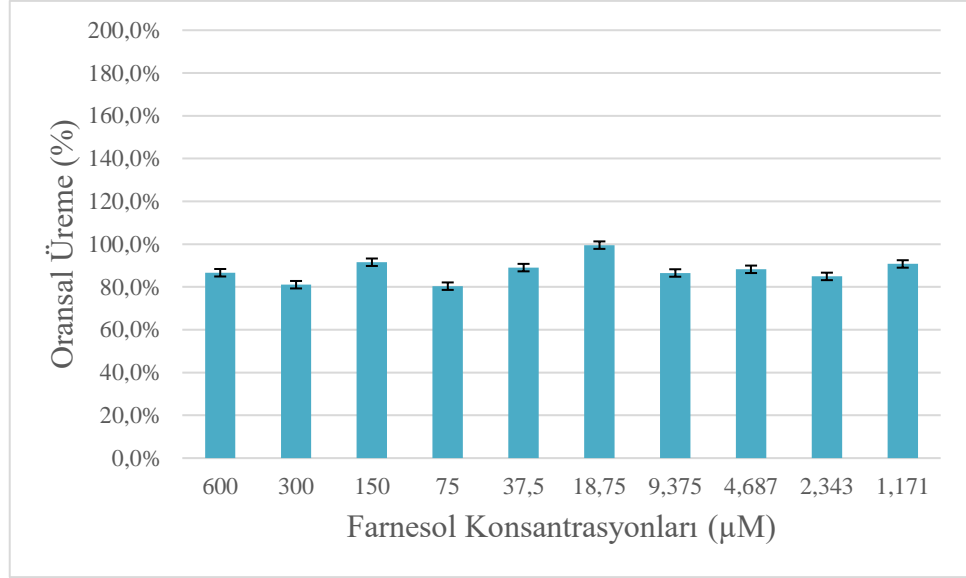
μM -75 μM (Şekil 4.3 ve Şekil 4.7); *C. krusei* 1561 ve *C. parapsilosis* 1799 izolatları için 600 μM -18,75 μM (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6) farnesol konsantrasyon aralıklarında genel olarak %100'ün altında üreme göstermiştir. Her grafik için 10 veriyi içeren standart sapma (SD) değerleri aşağıda sunulmuştur.



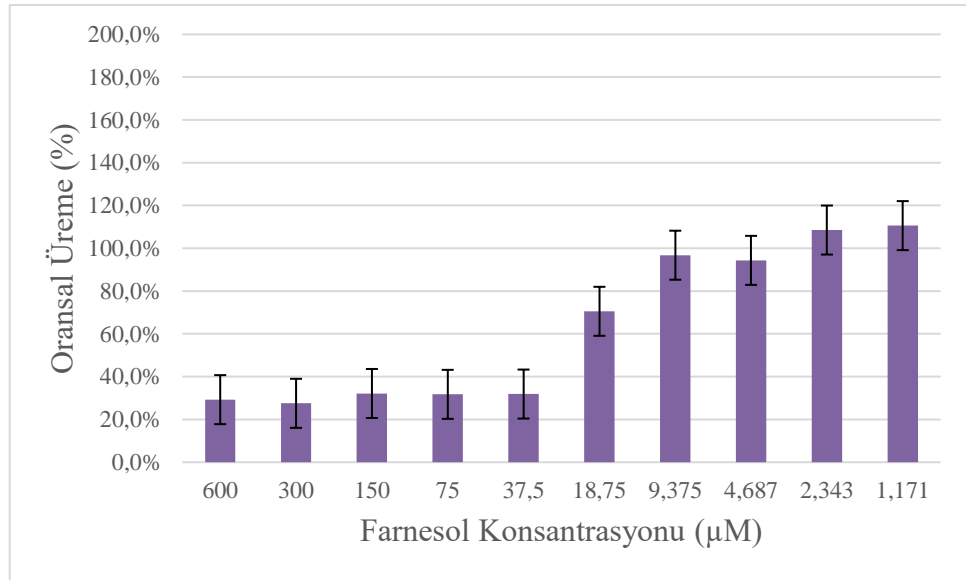
Şekil 4.2. *C. albicans* ATCC 14053 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal üreme değerleri (SD:0,28)



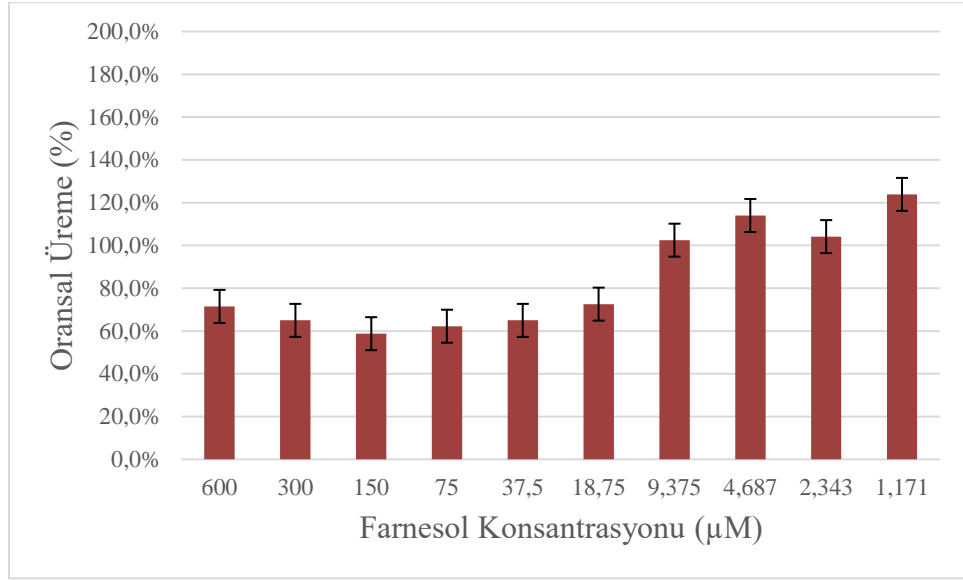
Şekil 4.3. *C. albicans* 1766 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal üreme değerleri (SD:0,27)



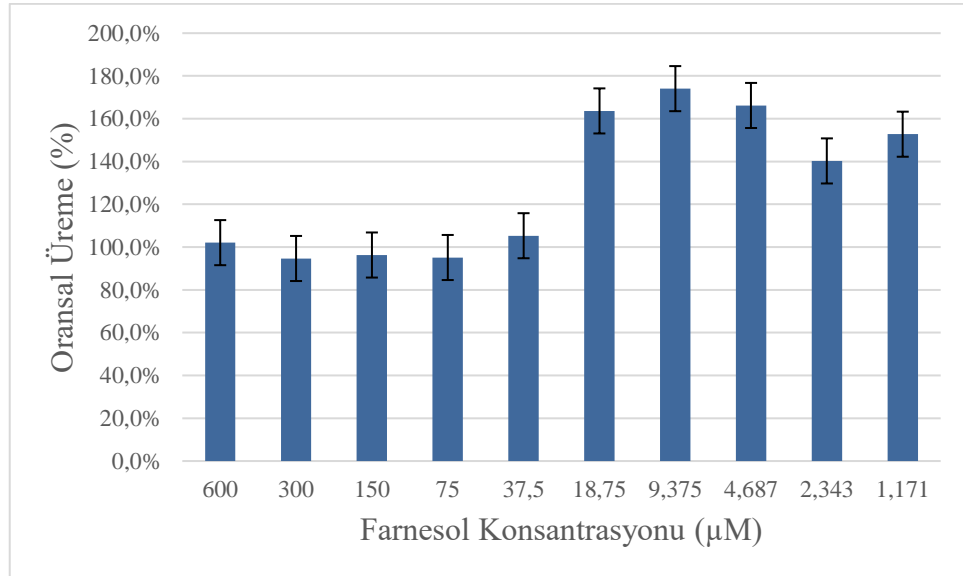
Şekil 4.4. *C. tropicalis* 1678 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal üreme değerleri (SD:0,05)



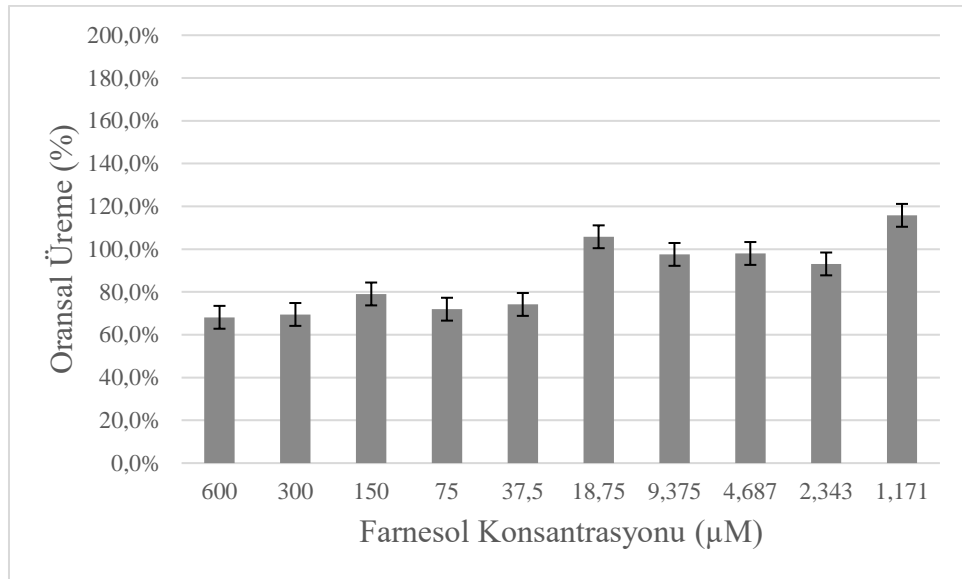
Şekil 4.5. *C. krusei* 1561 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal üreme değerleri (SD: 0,36)



Şekil 4.6. *C. parapsilosis* 1799 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal üreme değerleri (SD: 0,24)



Şekil 4.7. *C. kefyr* 1798 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal üreme değerleri (SD: 0,33)



Şekil 4.8. *C. glabrata* 1744 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal üreme değerleri (SD: 0,16)

Elde edilen tüm sonuçlar göz önüne alındığında, farnesolün herhangi bir fungisidal ya da fungistatik etkisi gözlenmemekle beraber, literatürle de uyumlu olarak 37,5 µM-600 µM konsantrasyon aralıklarında kontrol grubuna göre üremeyi azalttığı ya da yavaşlattığı tespit edilmiştir.

Farnesol 18,75 µM–1,17 µM konsantrasyon aralıklarında ise ilginç bir şekilde kontrol grubuna göre üremeyi genel olarak daha da arttırmıştır.

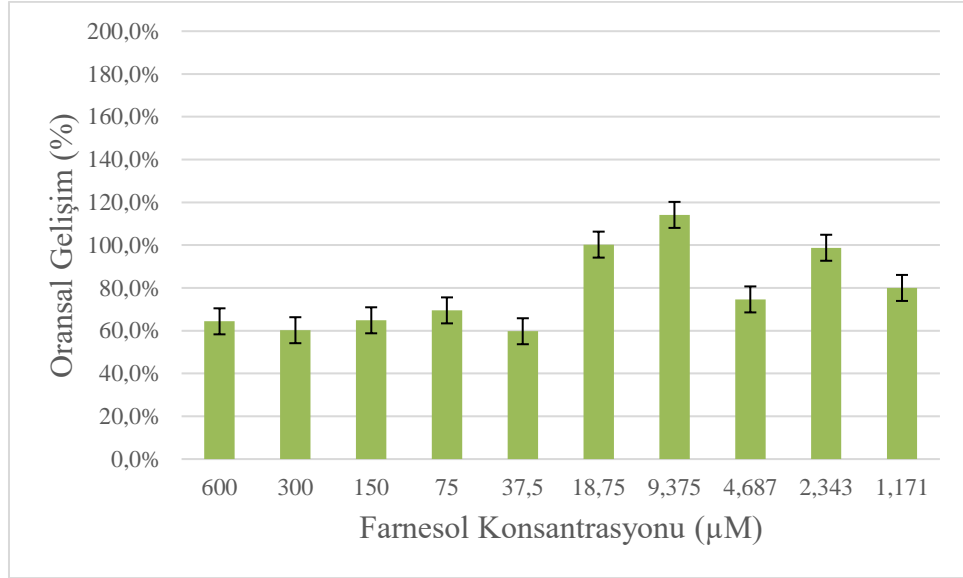
Farnesol pek çok mikroorganizma tarafından üretilen seskiterpen bir alkol olup bazı esansiyel yağlarda da bulunur. Özellikle *C. albicans*'ın bir virülans faktörü ve QS molekülü olarak oldukça iyi biçimde tanımlanmıştır. Şimdiye kadar yapılan çeşitli çalışmalarda farnesolün çeşitli bakteri ve mantarların gelişimini etkileyebildiği ve bir antimikrobiyal ajan olarak olası potansiyel rolü büyük dikkat çekmektedir (Jabra-Rizk vd., 2006). Jabra-Rizk vd. (2006), *S. aureus* biyofilmi ve antimikrobiyal duyarlılığı üzerine farnesolün gentamisin gibi potansiyel uygulaması olan ilaçlarla sinerjistik kullanımının faydalı olabileceğini rapor etmişlerdir (Jabra-Rizk vd., 2006). Semighini vd. (2008), farnesol ile *Fusarium graminearum* üreme ve gelişiminin inhibisyonu ile ilgili yaptıkları çalışmalarında farnesol bitki patojenik fungusu olan bu türün apoptozunu tetiklemiştir ve araştırmacılar farnesolün bu anlamda antifungal bir bileşen olarak potansiyelini rapor etmişlerdir (Semighini vd., 2008).

Langford vd. (2010), hücrenin farklı fazları baz alınarak *C. albicans* için letal olabilen farnesol konsantrasyonlarını araştırmışlardır. Bu çalışmada özellikle zengin üreme ortamında (YPD) 300 µM'a kadar olan farnesol konsantrasyonlarında minimal hücre ölümü gözlemlenmiştir ve sadece ≥ 300 µM konsantrasyonlarda gelişim inhibisyonu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak *C. albicans* ATCC 14053 ve *C. albicans* 1766 izolatları için 37,5 µM-300 µM konsantrasyonlarında minimal inhibisyon %10'a kadar gerçekleşirken, 300 µM ve 600 µM konsantrasyonlarda yaklaşık %20-30 arası gelişim inhibisyonu gözlemlenmiştir. Çalışmamızdaki diğer 5 farklı izolat için bu inhibisyon değeri türden türe oldukça farklılaşmaktadır. *C. tropicalis* 1678, *C. krusei* 1561, *C. parapsilosis* 1799 ve *C. glabrata* 1744 için 37,5 µM-600 µM konsantrasyonlarda belirgin bir inhibisyon gözlemlenirken *C. kefyr* 1798 için 75 µM-300 µM konsantrasyonda minimal inhibisyon gözlemlenmiştir (Langford vd., 2010).

4.1.2. Farnesolün *Candida* biyofilm oluşumu üzerine etkisinin XTT indirgeme testine dayalı sonuçları

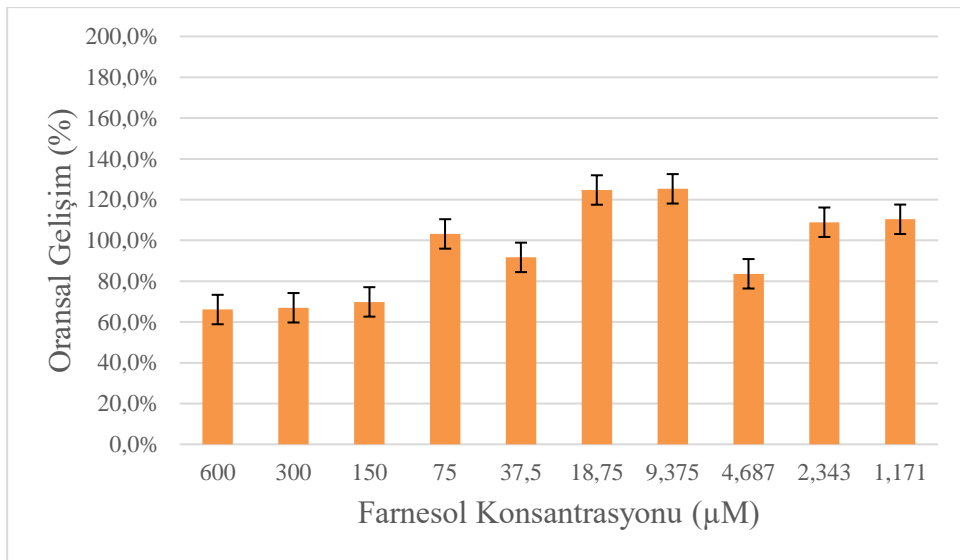
Farnesolün *Candida* biyofilm oluşumu üzerine etkisinin XTT indirgeme testi ile elde edilen sonuçları aşağıda 7 ayrı şekilde sunulmuştur (Şekil 4.9–4.15). Tüm çizelgelerde farnesol içermeyen kontrol grubunun biyofilm gelişimi %100 kabul edilmiştir. Her grafik için 10 veriyi içeren standart sapma değerleri aşağıda sunulmuştur. Elde edilen veriler şu şekilde özetlenebilir:

Farnesol 600 μM -37,5 μM konsantrasyon aralıklarında kullanıldığında, *C. albicans* ATCC 14053 izolatının biyofilm gelişimini yaklaşık %30-40 oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.9).



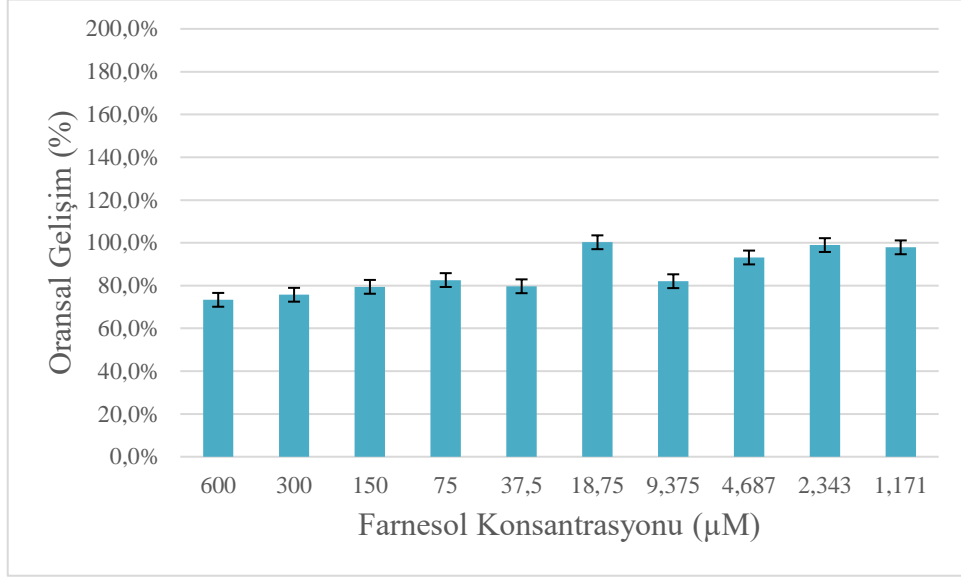
Şekil 4.9. *C. albicans* ATCC 14053 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,19)

Farnesol 600 μM -150 μM konsantrasyon aralıklarında kullanıldığında, *C. albicans* 1766 izolatının biyofilm gelişimini yaklaşık %30-40 oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.10).



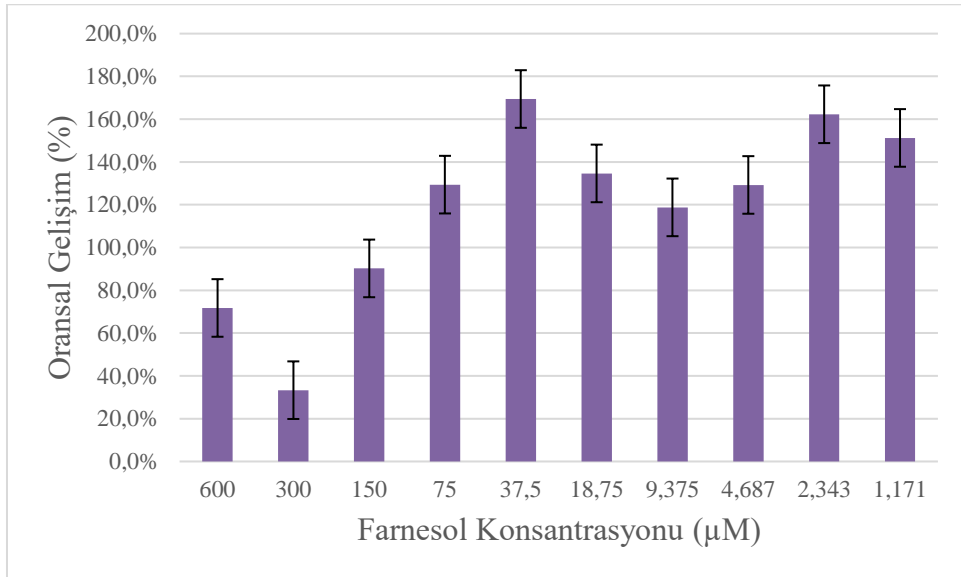
Şekil 4.10. *C. albicans* 1766 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,22)

Farnesol 600 μM –37,5 μM konsantrasyon aralıklarında kullanıldığında, *C. tropicalis* 1678 izolatının biyofilm gelişimini yaklaşık %15-30 oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.11).



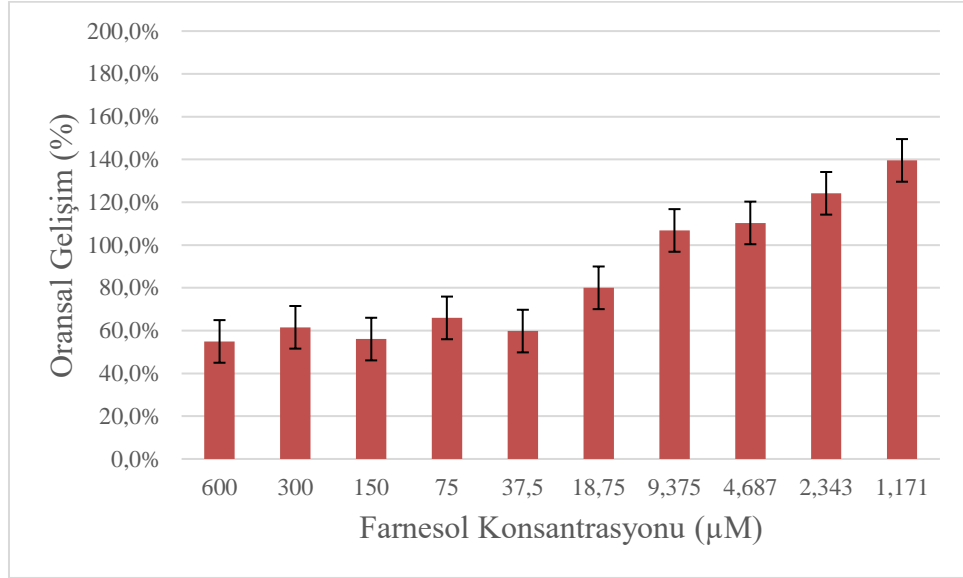
Şekil 4.11. *C. tropicalis* 1678 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,1)

Farnesol 600 μM –150 μM konsantrasyon aralıklarında kullanıldığında, *C. krusei* 1561 izolatının biyofilm gelişimini yaklaşık %10-70 oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.12).



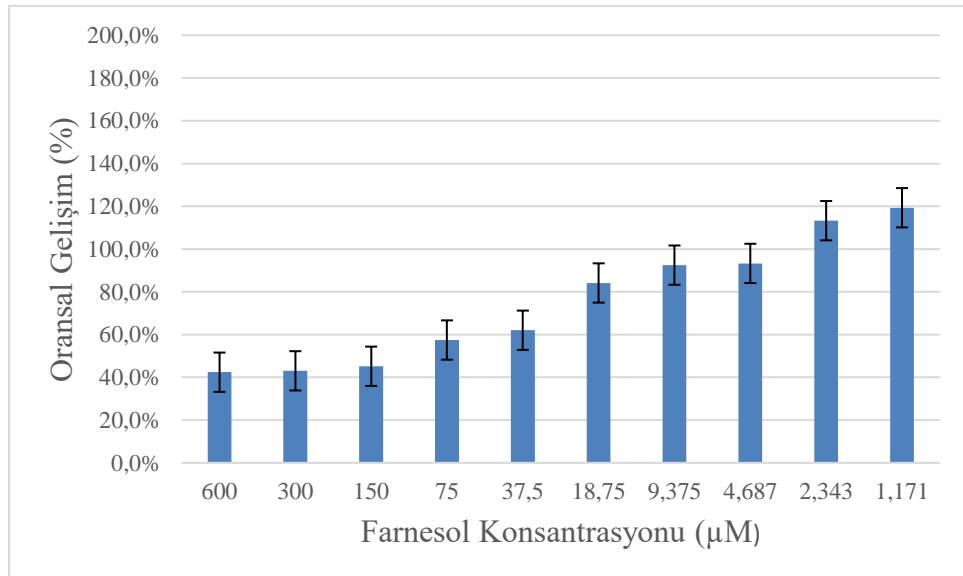
Şekil 4.12. *C. krusei* 1561 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,42)

Farnesol 600 μM –18,75 μM konsantrasyon aralıklarında kullanıldığında, *C. parapsilosis* 1799 izolatının biyofilm gelişimini yaklaşık %20-45 oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.13).



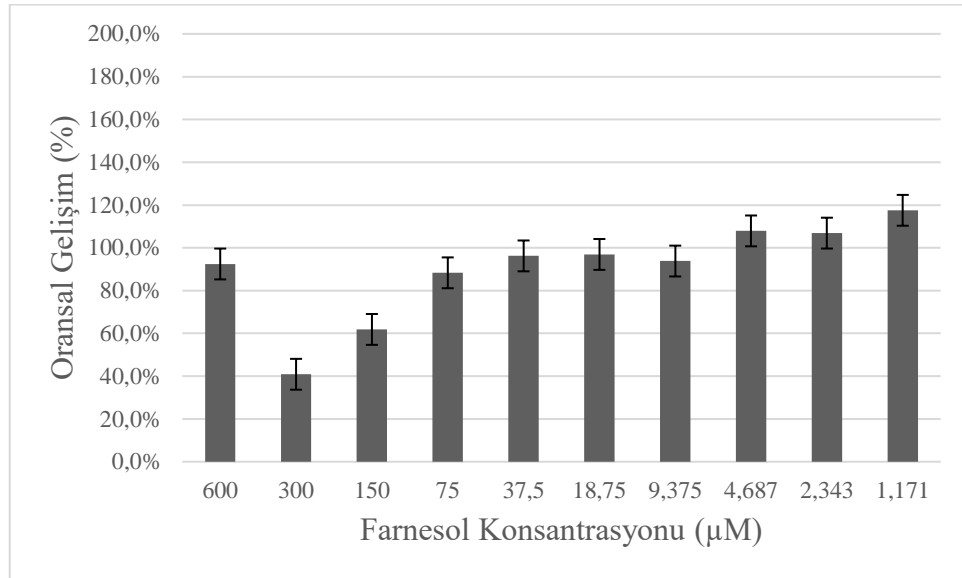
Şekil 4.13. *C. parapsilosis* 1799 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,31)

Farnesol 600 μM –4,687 μM konsantrasyon aralıklarında kullanıldığında, *C. kefyr* 1798 izolatının biyofilm gelişimini yaklaşık %5-60 oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *C. kefyr* 1798 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,29)

Farnesol 600 μM –9,375 μM konsantrasyon aralıklarında kullanıldığında, *C. glabrata* 1744 izolatının biyofilm gelişimini yaklaşık %5-60 oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.15).



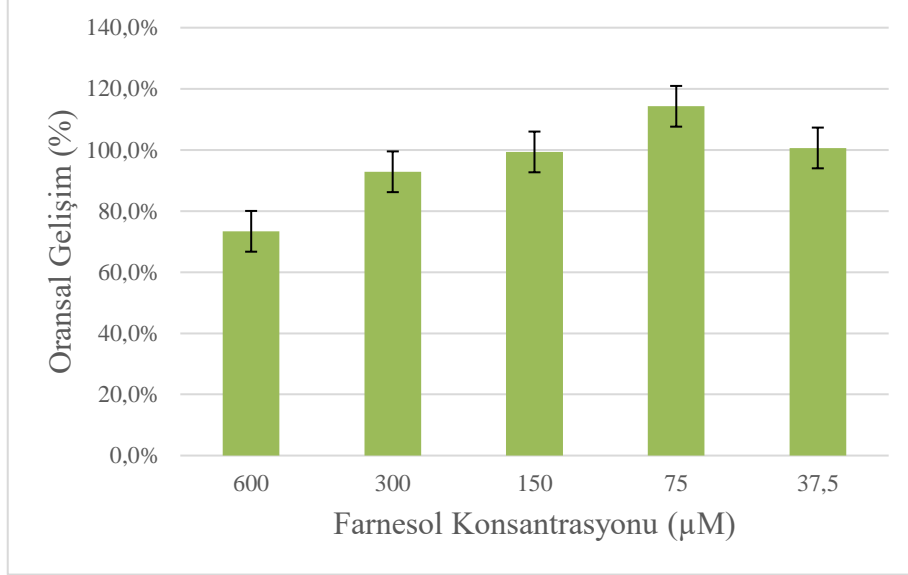
Şekil 4.15. *C. glabrata* 1744 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,22)

Farnesolün *Candida* biyofilmleri üzerine XTT indirgeme testi ile elde edilen tüm veriler dikkate alındığında, farnesol henüz biyofilm oluşmadan (0. saatte) *Candida* hücreleri üzerine uygulandığında genel olarak biyofilmi azaltıcı etki göstermiştir. İlginç bir şekilde bu etki farnesolün planktonik hücreler üzerine gösterdiği antimikrobiyal etki konsantrasyonlarından çok daha düşük oranlardadır.

4.1.3. Farnesolün oluşmuş *Candida* biyofilmi üzerine etkisinin XTT indirgeme testi ile tayinine dayalı sonuçları

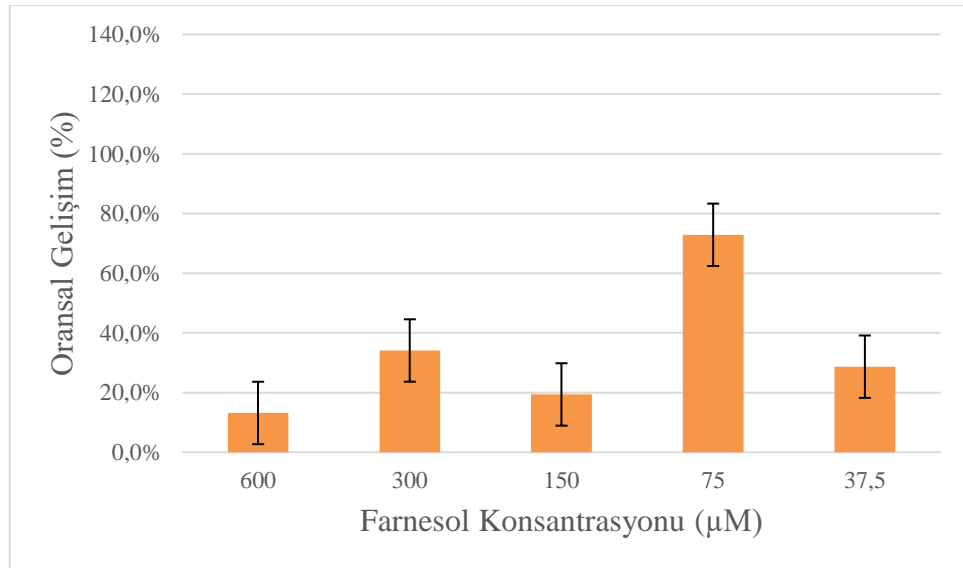
Farnesolün oluşmuş *Candida* biyofilmi üzerine etkisinin XTT indirgeme testi ile elde edilen sonuçları aşağıda 7 ayrı şekilde sunulmuştur (Şekil 4.16–4.22). Çalışmamızın bu aşamasında mikrodilüsyon ve prebiyofilm (0. saatte) uygulamalarında elde edilen veriler de dikkate alınarak daha dar bir konsantrasyon aralığı kullanılmıştır (600 μM -37,5 μM). Tüm çizelgelerde farnesol içermeyen kontrol grubunun biyofilm gelişimi %100 kabul edilmiştir. Her grafik için 5 veriyi içeren standart sapma değerleri aşağıda sunulmuştur. Farnesolün önceden oluşmuş biyofilm üzerine (24. saatte) uygulanan ve 72. saatte elde edilen XTT sonuçları şu şekilde açıklanabilir:

Farnesol 600 μM –300 μM konsantrasyon aralıklarında kullanıldığında, *C. albicans* ATCC 14053 izolatının biyofilm gelişimini yaklaşık %7-30 oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.16).



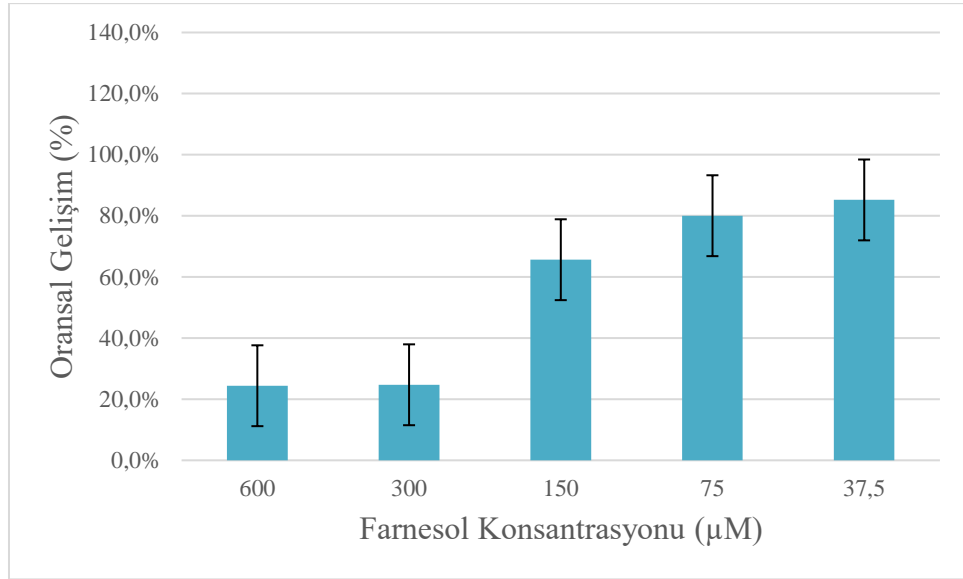
Şekil 4.16. *C. albicans* ATCC 14053 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,15)

Farnesol 600 μM –37,5 μM konsantrasyon aralıklarında kullanıldığında, *C. albicans* 1766 izolatının biyofilm gelişimini yaklaşık %30-85 oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.17).



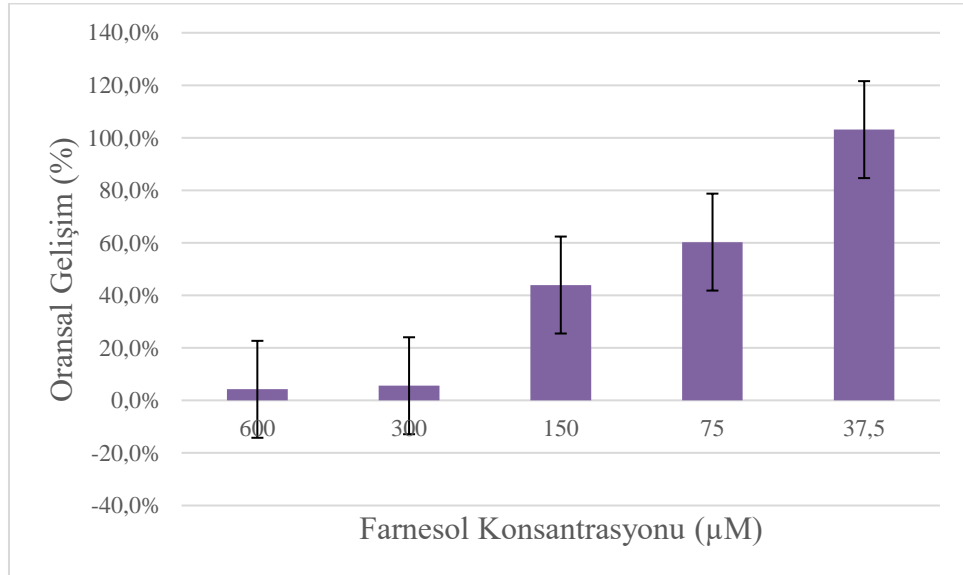
Şekil 4.17. *C. albicans* 1766 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,22)

Farnesol 600 μM –37,5 μM konsantrasyon aralıklarında kullanıldığında, *C. tropicalis* 1678 izolatının biyofilm gelişimini yaklaşık %15-75 oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.18).



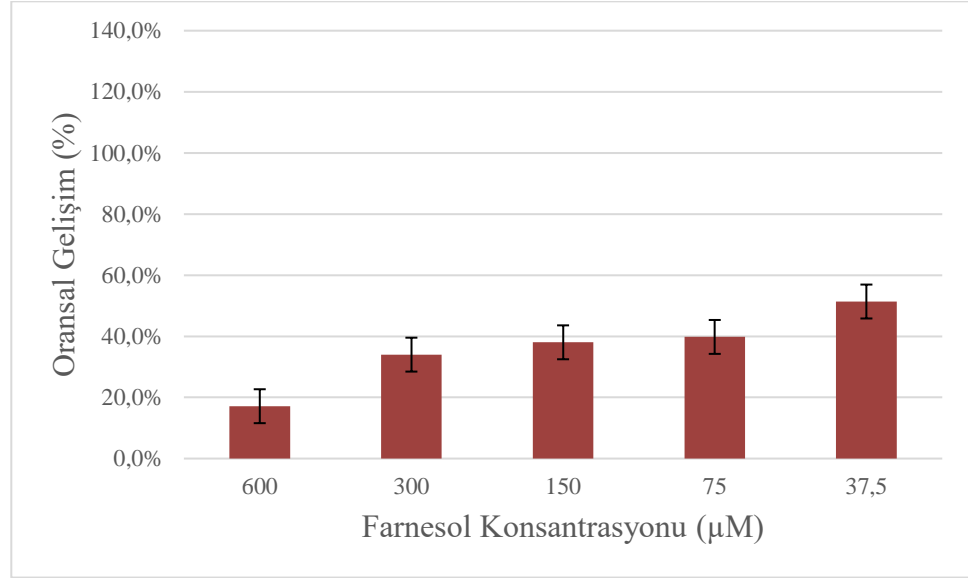
Şekil 4.18. *C. tropicalis* 1678 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,29)

Farnesol 600 μM –75 μM konsantrasyon aralıklarında kullanıldığında, *C. krusei* 1561 izolatının biyofilm gelişimini yaklaşık %40-95 oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.19).



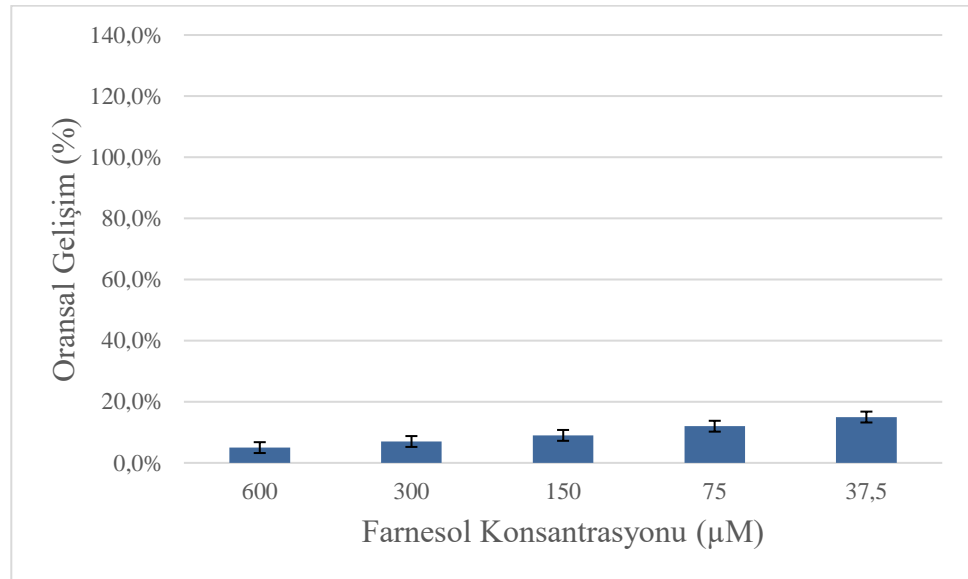
Şekil 4.19. *C. krusei* 1561 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,41)

Farnesol 600 μM –37,5 μM konsantrasyon aralıklarında kullanıldığında, *C. parapsilosis* 1799 izolatının biyofilm gelişimini yaklaşık %50-85 oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.20).



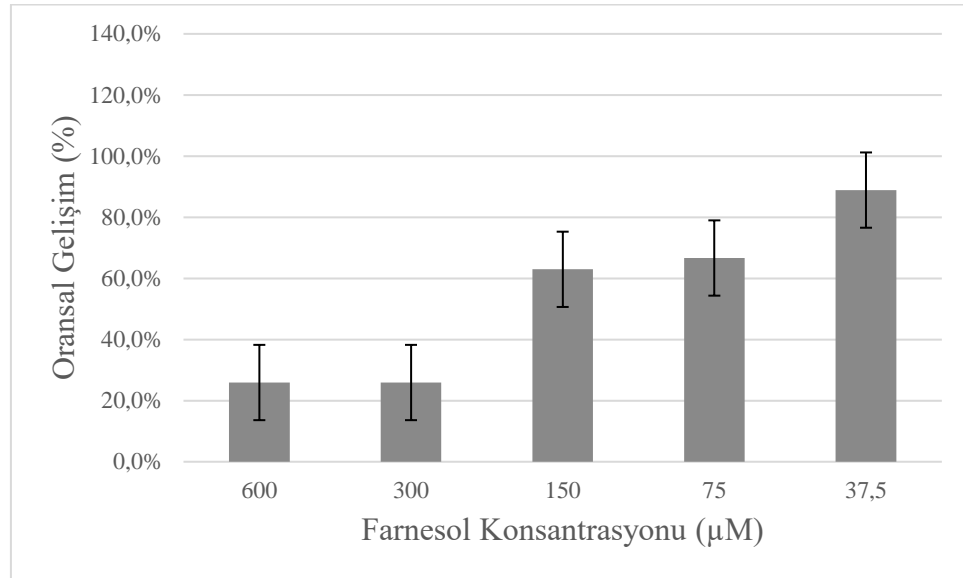
Şekil 4.20. *C. parapsilosis* 1799 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,14)

Farnesol 600 μM –37,5 μM konsantrasyon aralıklarında kullanıldığında, *C. kefyr* 1798 izolatının biyofilm gelişimini yaklaşık %85-95 oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. *C. kefyr* 1798 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,04)

Farnesol 600 μM –37,5 μM konsantrasyon aralıklarında kullanıldığında, *C. glabrata* 1744 izolatının biyofilm gelişimini yaklaşık %10-75 oranında inhibe etmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. *C. glabrata* 1744 izolatının farnesolün farklı konsantrasyonlarındaki oransal gelişim değerleri (SD: 0,27)

Farnesolün önceden oluşmuş *Candida* biyofilmleri (24. saatte) üzerine XTT indirgeme testi ile elde edilen tüm verileri dikkate alındığında, genel olarak biyofilmi azaltıcı etkisi olduğu gözlemlenmiştir. XTT sonuçlarına göre post biyofilmin pre biyofilme göre oransal olarak inhibisyon değeri daha yüksektir. Bu sonuçlar farnesolün oluşmuş biyofilmdeki adhezyon bağları üzerine etkisinden kaynaklanmış olabilir.

Hem prebiyofilm hem de post biyofilm çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre biyofilm indirgenmesinde farnesol konsantrasyonunun çok önemli olduğu söylenebilir. *C. albicans* ATCC 14053 için farnesol, prebiyofilm çalışmalarında min 37,5 μM konsantrasyonda (Şekil 4.9) etkili iken, post biyofilm çalışmasında min 300 μM konsantrasyonda (Şekil 4.16) inhibe edici etki göstermiştir Diğer yandan klinik *C. albicans* 1766 için farnesol prebiyofilm çalışmalarında min 150 μM konsantrasyonda (Şekil 4.10) etkili iken, post biyofilm çalışmalarında min 37,5 μM konsantrasyonda (Şekil 4.17) inhibe edici etki göstermiştir.

Ramage vd. (2002), farnesol ile *C. albicans* biyofilminin inhibisyonunu araştırdıkları çalışmalarında *C. albicans* için mikropilake yüzeyine yapışan hücre popülasyonu 0, 1, 2 ve

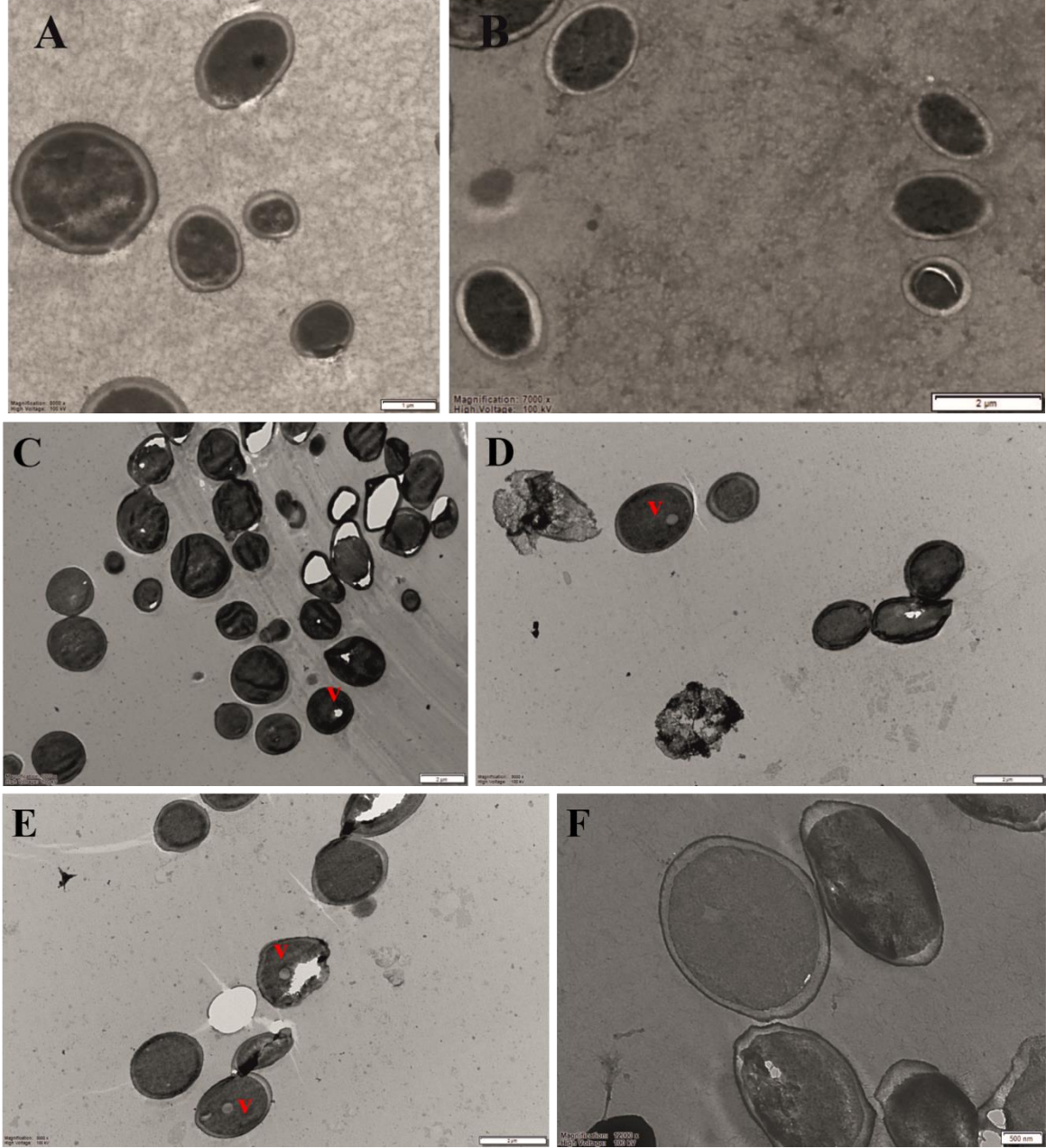
4 saat sonra ve 24 saatlik biyofilm durumlarında çeşitli konsantrasyonlarda farnesol ile muamele sonucu (0, 3, 30 ve 300 μ M) elde edilen XTT verilerini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar farnesolün etkisinin hem konsantrasyon hem başlangıç yapışma süresine bağımlı olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada 300 μ M farnesol ile ön inkübasyon biyofilm oluşumunu tamamen inhibe etmiştir. Olgun biyofilmden elde edilen süpernatant, planktonik *C. albicans*'ın filament oluşumunu inhibe etme özelliğinde bulunmuştur ve yazarlar bu durumun biyofilmde insitu olarak üretilen morfogenetik otoregülatör bir bileşenin bulunmasına işaret etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da ekzojen olarak verdiğimiz farnesol, prebiyofilm (0. saat) ve post biyofilm (24. saat) oluşum ve gelişimini tamamen inhibe etmese de, *C. albicans* ATCC 14053 ve *C. albicans* 1766 için pre biyofilm oluşumunu yaklaşık %30-40 oranında inhibe etmiştir. Diğer yandan farnesol *C. albicans* ATCC 14053 için post biyofilm gelişimini yaklaşık %7-30 oranında inhibe ederken, bu değer *C. albicans* 1766 için yaklaşık %30-85 oranındadır. Çalışmamızdaki diğer 5 farklı izolat için pre ve post biyofilm inhibisyon oranları oldukça farklılık göstermekle birlikte bazı türler için daha yüksek inhibisyon değerleri gözlenmiştir. Prebiyofilmde *C. tropicalis* 1678 için %15-30 oranında, *C. parapsilosis* 1799 için %20-45 oranında, *C. kefyr* 1798 için %5-60 oranında, *C. glabrata* 1744 %5-60 oranında, *C. krusei* 1561 için %10-70 oranında inhibisyon izlenmiştir. Post biyofilmde ise *C. tropicalis* 1678 %15-75 oranında, *C. glabrata* 1744 %10-75 oranında, *C. parapsilosis* 1799 %50-85 oranında, *C. krusei* 1561 %40-95 oranında, *C. kefyr* 1798 %85-95 oranında inhibisyon gözlenmiştir.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda farnesolün *C. albicans* biyofilm oluşumunu inhibe etme potansiyeli oldukça fazla çalışılmış olmasına rağmen, NAC türlerin biyofilmleri üzerine farnesolün etkisi çok sınırlı sayıda araştırılmıştır (Weber vd., 2010). Weber vd. (2010), sadece *C. albicans* ve *C. dubliniensis* değil, diğer *Candida* türlerinin de endojen olarak farnesol üretebildiğini ancak konsantrasyonları çok düşük olduğundan muhtemelen biyofilm oluşumunda rol almadığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda farnesol ekzojen olarak uygulanmış ve çalışılan tüm NAC izolatlarında biyofilm oluşumu üzerine yüksek oranlarda inhibe edici etki göstermiştir.

Dizova ve Bujdakova (2017), *C. albicans* üzerine farnesolün etkisinin konsantrasyon bağımlı olduğunu; 200 μ M -300 μ M konsantrasyonun mayalar için stres yaratırken 40 μ M konsantrasyonun stresten koruduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da farnesolün

Candida türleri üzerine etkisi göz önüne alındığında yaklaşık 37,5 µM-600 µM konsantrasyonda biyofilm indirgenmesi genel olarak tüm izolatlarda net olarak görülmüştür. Diğer yandan farnesol yaklaşık 37,5 µM altındaki konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu arttırıcı etki göstermiştir (Dizova ve Bujdakova, 2017).

4.1.4. Farnesolün planktonik *Candida* hücreleri üzerine etkisinin geçirimli elektron mikroskopi (TEM) görüntüleme sonuçlarına göre değerlendirilmesi



Şekil 4.23. Kontrol grubu ve farnesol uygulanan planktonik *C. albicans* ATCC 14053 izolatına ait TEM görüntüleri (Resim A, B: farnesol uygulanmamış planktonik *C. albicans* ATCC 14053 izolatına ait kontrol grubu (Resim A skala bar: 1 µm, Resim B skala bar: 2 µm); Resim C, D, E, F: farnesol uygulanmış planktonik *C. albicans* ATCC 14053 izolatına ait inceleme grubu (Resim C skala bar: 2 µm, Resim D skala bar: 2 µm, Resim E skala bar: 2 µm, Resim F skala bar: 500 nm); v=vakuol, koful)

Farnesolün planktonik *C. albicans* ATCC 14053 izolatu üzerine ultrayapısal etkilerinin TEM ile incelenebilmesi amacıyla kontrol ve deney grubuna ait örneklerden en az 10 alan detaylı olarak taranmış ve ortak gözlenen bulgular ışığında değerlendirmeler yapılmıştır. Seçilen örnek TEM resimleri Şekil 4.23'de sunulmuştur. Kontrol grubunda normal, oval ve yuvarlak görünümlü *Candida* morfolojisi izlenmiş olup hücre duvar ve membran yapıları bütün olarak izlenmiştir (Şekil 4.23 A ve B). 37,5 µM konsantrasyonda farnesol ile muamele edilen *Candida* hücrelerinin ultrayapısal görüntüleri incelendiğinde, bazı *Candida* hücrelerinin normal sağlıklı görünümlerini korumaya devam ettiği tespit edilmiş olup bazı hücrelerde ise hücre duvar ve membran yapısı ile sitoplazmanın ayrıldığı ve sitoplazmanın içe çöktüğü gözlenmiştir (Şekil 4.23 C, E ve F). Ayrıca hücrelerde vakuolizasyon artışı ve yer yer granülasyonlar tespit edilmiştir (Şekil 4.23 C, D ve E). Çok az sayıda içi tamamen boşalmış hayalet hücre (ghost cell) görülmüştür (Şekil 4.23 C). Bazı hücrelerdeki sitoplazma elektronca çok yoğun şekilde görüntülenmiştir (Şekil 4.23 C). Şekil 4.23 D'de ise tamamen lize olmuş maya hücreleri gözlenmektedir (Şekil 4.23).

Decanis vd. (2011), yaptığı bir çalışmada farnesol ile muamele edilen *C. albicans* hücreleri içerisinde büyük ve düzensiz kofullar izlenmiştir. Bu kofullar özellikle hücrelerin periferinde daha yoğundur ayrıca sitoplazmada granülasyon artışı, hücre duvar bütünlüğünde azalma ve membranda zayıflık tespit edilmiştir. TEM verilerimiz araştırmacıların bulguları ile benzerlikler göstermektedir (Decanis vd., 2011).

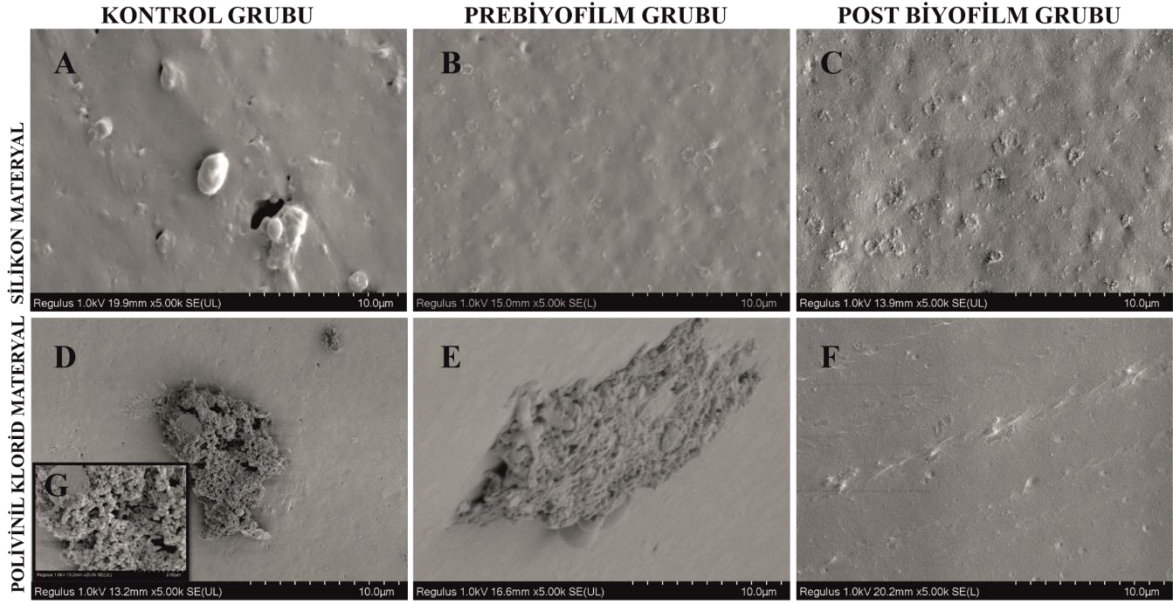
4.1.5. Farklı biyomateryaller üzerinde farnesolün *Candida* biyofilmine etkilerinin SEM ile değerlendirilmesi

Çalışmamızda kullanılan SEM uygulamaları için iki farklı yüzey kullanılmış olup bunlar silikon ve polivinil klorid materyallerini içermektedir. Her grup için önce kontrol örnekleri ve sonrada yüzeyler üzerinde ve iki farklı zaman aralığında (6. saat ve 24. saat) 300 µM konsantrasyonda elde edilen veriler karşılaştırılmıştır. Ayrıca her grup için pre ve post biyofilm durumlarını gösteren mikrograflar verilmiştir.

***C. albicans* ATCC 14053 izolatu için 6. saatte elde edilen SEM Görüntüleri** incelendiğinde, kontrol grubu bulguları yoğun bir adezyon ve biyofilm oluşumu göstermemekle beraber yer yer maya hücreleri ve EPS yapısı tespit edilmiştir. Ancak bu

durum biyofilm oluşum aşamasının erken evreleri dolayısıyla gözlenmiş bir bulgu olabilir. Özellikle kontrol grubundaki polivinil klorid yüzeylerdeki adezyon, silikon yüzeye göre daha fazladır (şekil 4.24).

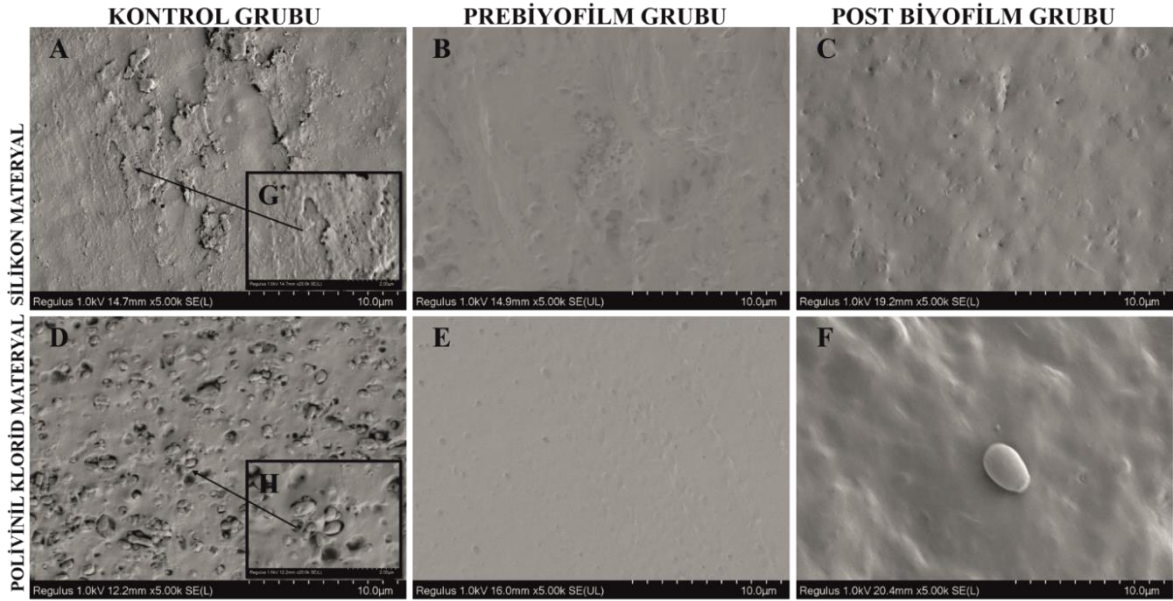
Aynı izolat için silikon yüzeyler üzerinde farnesolün 6. saatteki pre ve post biyofilm etkileri göz önüne alındığında, her iki grup arasında bariz bir fark olmamakla beraber, biyofilm oluşumuna çok az rastlanmıştır. Polivinil klorid yüzeyler üzerinde ise kontrol grubuna kıyasla pre biyofilm oluşumu daha az olarak belirlemiştir. Post biyofilm durumunda ise pre biyofilm oluşumuna göre yok denecek kadar az derecede bir biyofilm yapısı izlenmiştir (şekil 4.24).



şekil 4.24. *C. albicans* ATCC 14053 6. saat SEM Görüntüleri

C. albicans 1766 izolatu için 6. saatte elde edilen SEM Görüntüleri incelendiğinde, kontrol grubu bulguları yoğun bir adezyon ve biyofilm oluşumu göstermese de, biyofilm oluşumunun erken evrelerine dair bulgular mevcuttur. Klinik izolat *C. albicans* 1766, *C. albicans* ATCC 14053'e göre daha fazla biyofilm oluşturma eğilimindedir. Kontrol grubundaki silikon yüzeylerde adezyon polivinil klorid yüzeye göre daha fazladır (Şekil 4.25).

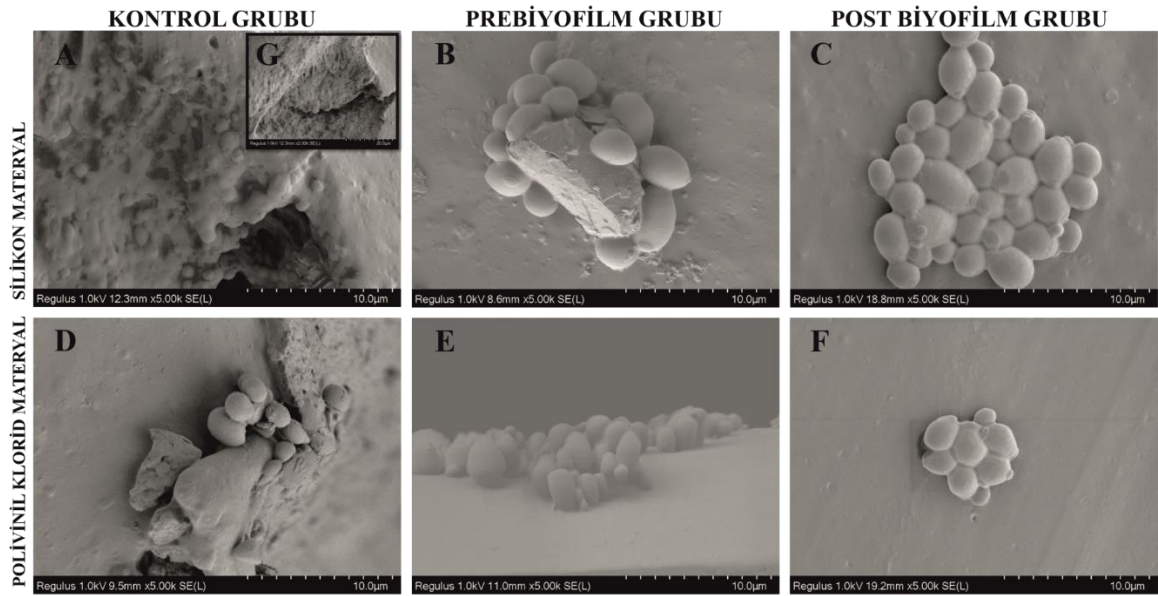
Aynı izolat için silikon yüzeyler üzerinde farnesolün 6. saatteki prebiyofilm etkileri gözlemlendiğinde, yer yer biyofilm oluşumu izlenirken, post biyofilm grubundaki adezyon daha da azalmıştır. Polivinil klorid yüzeyler için, kontrol grubuna kıyasla pre biyofilm grubunda biyofilm oluşumu gözlenmezken, post biyofilm grubunda ise sadece biyofilm fragmentleri izlenmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. *C. albicans* 1766 6. saat SEM Görüntüleri

C. albicans ATCC 14053 izolatı için 24. saatte elde edilen SEM Görüntüleri incelendiğinde, her iki yüzeyin kontrol grubu bulguları olgun biyofilm oluşumu göstermektedir. Bu grupta yüzey üzerine yoğun mikroorganizma tutunması ve EPS oluşumu görülmektedir. Silikon materyal üzerinde polivinil klorid materyale göre daha fazla biyofilm tespit edilmiştir (Şekil 4.26).

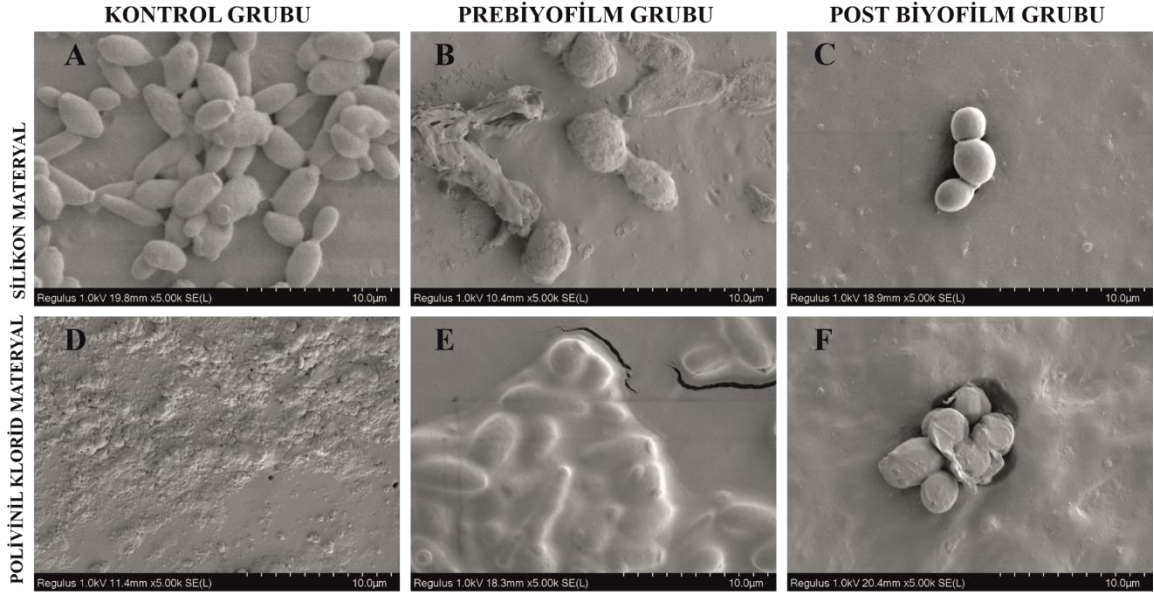
Aynı izolat için silikon yüzeyler göz önüne alındığında, 24. saatteki prebiyofilm grubunda yer yer adezyon gözlene de filamentöz yapı gözlenmemiştir. Post biyofilm grubunda ise biyofilm fragmentleri görülmekle birlikte filamentöz yapılar izlenmemiştir. Polivinil klorid yüzeyler üzerindeki prebiyofilm grubunda biyofilmde indirgenme izlenmiş, EPS azalmış ve filamentasyon gözlenmemiştir ancak hücre gruplarında tutunma hala mevcuttur. Post biyofilm grubunda ise biyofilm fragmentleri vardır ancak indirgenme çok net bir şekilde izlenmektedir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. C. albicans ATCC 14053 24. saat SEM Görüntüleri

C. albicans 1766 izolatı için 24. saatte elde edilen SEM Görüntüleri incelendiğinde, kontrol grubunda adezyon ve biyofilm oluşumu mevcut olmakla birlikte, polivinil klorid yüzeylerdeki adezyon, silikon yüzeye göre daha fazladır (Şekil 4.27).

Aynı izolat için silikon yüzeylerde farnesolün 24. saatteki pre biyofilm etkileri göz önüne alındığında, yüzeyden kopan hücresel yapılar izlenirken, post biyofilm grubunda daha küçük hücresel fragmentlere rastlanmıştır. Polivinil klorid yüzeyler üzerindeki biyofilm oluşumu pre biyofilm grubunda bir miktar azalmakla birlikte, EPS yapısı hala net olarak izlenmektedir. Post biyofilm grubunda ise EPS yapısı görüntülenmemiştir ancak tutunma eğilimindeki hücresel yapılar mevcuttur (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. *C. albicans* 1766 24. saat SEM Görüntüleri

Elde edilen tüm SEM verileri göz önüne alındığında:

Langford vd. (2010), Yapılan araştırmalarda 300 µM kadar olan farnesol düzeyleri üretim hızını değiştirmemesine rağmen hücreler filamentöz formun aksine maya olarak gelişirler. Bizim SEM ile gerçekleştirdiğimiz pre ve post biyofilm çalışmalarında da farnesol 300 µM konsantrasyonda kullanılmış ve *C. albicans* ATCC 14053 ile *C. albicans* 1766 izolatlarına ait biyofilmlerde filamentöz formdan ziyade maya formu izlenmiştir (Langford vd., 2010). Diğer yandan farnesolün *C. albicans* ile farklı konsantrasyonlardaki muameleleri sonucu elde edilen SEM mikrografları hücrelerin dış morfolojilerinde bozulmalara işaret etmektedir. Araştırmacılar bu durumun sitozolik hacmin azalmasına işaret ettiğini belirtmişlerdir (Decanis vd., 2011).

Bulgularımıza göre post biyofilm (6. saat ve 24. saat uygulaması) grubunda prebiyofilm (0. saat uygulaması) grubuna kıyasla daha az biyofilm gözlenmiştir ve mikroorganizmalar yüzeyler üzerinde genel olarak küçük hücresel gruplar halinde gözlenmiştir. Bu durum, farnesolün yüzey ve hücreler arasındaki adhezyon bağlarını etkilemiş olmasından kaynaklanmış olabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Candida türleri önemli fırsatçı infeksiyonlara yol açan mikroorganizmalar olup oluşturduğu infeksiyonlar özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatış sürelerinin uzaması ve ekonomik problemler gibi çeşitli sorunlara neden olmaktadır. Polimorfik bir fungus olan *C. albicans* maya, hif ya da pseudohif olarak gelişebilir, her formun morfolojisi ve virülansı değişiklikler göstermektedir. Maya formu genellikle kommensal durumda görülürken hifal form dokuya invazyonu ve patojenezi arttırmaktadır. *Candida* hücre yoğunluğu hifal gelişimi etkileyen faktörlerden biridir.

Farnesol *C. albicans* tarafından sentezlenen bir QS molekülü olup maya hif geçişini bloklayan bir otoindükleyicidir. Antimikrobiyal, antibiyofilm ve antikanser özellikleri dikkat çekmektedir. Hücre yoğunluğu ve morfolojisini düzenleme yoğunluğuyla biyofilm oluşumunu da kontrol etmektedir. Bu yüzden fungal patojenitede önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Bu araştırmada farklı *Candida* türleri üzerine farklı farnesol konsantrasyonlarının etkisi mikrobiyolojik, kolorimetrik ve elektron mikroskopik yöntemlerle araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre; farnesolün *Candida* türlerinin planktonik ve biyofilm formları üzerine belirli konsantrasyon aralıklarında inhibe edici etkileri ortaya konulmuştur (yaklaşık 37,5 µM- 600 µM). Daha düşük konsantrasyonlarda ise muhtemelen *Candida* hücrelerini stresten koruyarak biyofilmi arttırıcı bir etki göstermiştir. NAC türleri gözönüne alındığında farnesol her tür için farklı konsantrasyon aralıklarında ve farklı oranlarda inhibe edici etki sergilemiştir. Planktonik *Candida* hücreleri üzerine 37,5 µM konsantrasyonda farnesol muamelesi sonucu elde edilen TEM verilerine göre hücrelerde membran ve duvar hasarları, vakuolizasyon ya da granülasyonlar görülürken, SEM verilerinde farnesol muamelesi sonucu pre ve post biyofilm uygulamalarında kontrol grubuna kıyasla biyofilm indirgenmesi bariz olarak ortaya konulmuştur. Bununla beraber farnesolün post biyofilm üzerine etkileri incelendiğinde filamentöz yapı gözlenmemekle birlikte hücresel fragmentlere rastlanmıştır Ayrıca çalışmamızda farnesolün *C. albicans* ATCC 14053 ve klinik izolat olan *C. albicans* 1766 izolatı üzerine etkileri karşılaştırıldığında klinik izolatta farnesol daha güçlü bir inhibe edici etki göstermiştir. Bu sebeple farnesolün antibiyofilm özelliklerinin hem koruyucu hem de tedavi stratejilerinde etkili olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Farnesolün *Candida* türleri üzerine umut verici antimikrobiyal ve antibiyofilm etkileri, geleneksel antifungal tedavi stratejilerine bir alternatif destek sağlayabilir. Mevcut antifungaller hem yüksek toksisite göstermekte ve hem de ilaç direnci gelişimi riskini arttırmaktadırlar. Farnesol bir QS molekülü olduğundan yapılacak detaylı araştırmalar sonucu terapötik ya da mevcut ilaçlarla kombine kullanımı bu sorunlara alternatif bir çözüm oluşturabilir. Diğer yandan hastane ortamlarındaki yüzey ve tıbbi cihaz dezenfeksiyonu ile ilgili olarak, biyofilm oluşumunu inhibe etmedeki koruyucu etkisi ayrıntılı biçimde araştırılmalıdır. Farnesolün *in vivo* toksik etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır ancak vücut içi biyomateryallerinde yüzey kaplama malzemesi olarak kullanımının etkileri de tedavi stratejilerine ışık tutabilecek araştırma konularından olabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmed, A., Azim, A., Baronia, A.K., Marak., K.R.S.K., Gurjar, M., 2014, Risk prediction for invasive candidiasis, *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 18(10), p.682-688
- Akan, E., Kınık, Ö., 2014, Biyofilm oluşum mekanizması ve biyofilmlerin gıda güvenliğine etkisi, *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 14, s.42-51
- Alby, K., Bennett, R.J., 2009, Stress-induced phenotypic switching in *Candida albicans*, *Molecular Biology of the Cell*, 20, p.3178-3191
- Alem, M.A.S., Oteef, M.D.Y., Flowers, T.H., Douglas, L.J., 2006, Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development, *Eukaryotic Cell*, 5(10), p.1770-1779
- Altun, H., Şener, B., 2008, Biyofilm enfeksiyonları ve antibiyotik direnci, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39, s.82-88
- Anonim, 2014, Morphology and general properties of fungi, <https://www.semanticscholar.org/paper/morphology-and-general-properties-of-fungi/21ec69b5be20507ee52fa4e348b0ec5ce6775246>, erişim tarihi: 20.09.2019
- Avkan Oğuz, V., 2019, Üriner sistemin kandida enfeksiyonları, *Türkiye Klinikleri Kandida Enfeksiyonları*, 1. Baskı, s.41-47
- Blankenship, J.R., Mitchell, A.P., 2006, How to build a biofilm: a fungal perspective, *Current Opinion in Microbiology*, 9, p.588-594
- Borg, M., Rüchel, R., 1990, Demonstration of fungal proteinase during phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*, *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 28(1), p.3-14
- Bozkurt, F., 2008, Nozokomiyal enfeksiyon etkeni olan ve steril vücut sıvılarından izole edilen kandida türlerinin tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıklarının e-test yöntemi ile belirlenmesi, *Uzmanlık Tezi*, T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, 110s
- Brown, M.R.W., Allison, D.G., Gilbert, P., 1988, Resistance of bacterial biofilm to antibiotics: a growth-rate related effect?, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22, p.777-783
- Butler, G., Rasmussen, M.D., Lin, M. F., Santos, M.A., Sakthikumar, S. vd., 2009, Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes, *Nature*, 459(7247), p.657-662

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cavalheiro, M., Teixeira, M.C., 2018, *Candida* biofilms: thereats, challenges and promising strategies, *Frontiers in Medicine*, 5(28)
- Clinical Laboratory Standarts Institute, 2002, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved Standard M27-A2, Wayne PA
- Corpus, K., Hegeman-Dingle, R., Bajjoka, I., 2004, *Candida kefyr*, an uncommon but emerging fungal pathogen: report of two cases, *Pharmacotherapy*, 24(8), p.1084-1088
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, 284, p.1318-1322
- Cullen, P.J., Sprague, G.F., 2012, The regulation of filamentous growth in yeast, *Genetics*, 190, p.23-49
- Çetin, Ç.B., 2019, Kandida enfeksiyonları ve antifungal profilaksi, *Türkiye Klinikleri Kandida Enfeksiyonları*, 1. Baskı, s.83-88
- Dağ, İ., 2007, Kaspofunginin *Candida glabrata*'nın klinik izolatlarına karşı vorikonazol, flukonazol, itrakonazol ve amfoterisin b ile kombinasyonlarının time-kill metodu, e-test metodu (iki farklı yöntemle) ve disk difüzyon yöntemleriyle *in vitro* etkilerinin değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 92s.
- Daniel, H.M., Lachance, M.A., Kurtzman, C.P., 2014, On the reclassification of species assigned to *Candida* and otheranamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription, *Antonie van Leeuwenhoek*, 106, p.67-84
- Decanis, N., Tazi, N., Correia, A., Vilanova, M., Rouabhia, M., 2011, Farnesol, a quorum-sensing molecule triggers *Candida albicans* morphological changes by downregulating the expression of different secreted aspartyl proteinase genes, *The Open Microbiology Journal*, 5, p.119-126
- Deorukhkar, S.C., Saini, S., Mathew, S., 2014, Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile, *International Journal of Microbiology*, 456878
- Derengowski, L.S., De-Souza-Silva, C., Braz, S.V., Mello-De-Sousa, T.M., Bao, S.N., 2009, Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8(13)
- Dizova, S., Bujdakova, H., 2017, Properties and role of the quorum sensing molecule farnesol in relation to the yeast *Candida albicans*, *Pharmazie*, 72, p.307-312

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Douglas, L. J., 2003, *Candida* biofilms and their role in infection, *Trends in Microbiology*, 11(1), p.30-36
- Erdem, H.A., Işıkgöz Taşbakan, M., 2019, Kardiyovasküler kandida enfeksiyonları, *Türkiye Klinikleri Kandida Enfeksiyonları*, 1. Baskı, s.14-18
- Fidel P.L., Vazquez, J.A., Sobel, J.D., 1999, *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease with comparison to *C. albicans*, *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), p.80-96
- Grover, N.D., 2010, Echinocandins: a ray of hope in antifungal drug therapy, *Indian Journal of Pharmacology*, 42(1), p.9-11
- Gülbaşaran, F., Gençoğlu, G., 2019, Mukokutanöz kandida enfeksiyonları, *Türkiye Klinikleri Kandida Enfeksiyonları*, 1. Baskı, s.1-7
- Gültekin, A., Koç, A.N., Atalay, M.A., 2013, *Candida* türlerinin tanımlanmasında kromojenik besiyerinin değerlendirilmesi, *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 22(1), s.24-30
- Han, X.Y., 2006, Automated blood cultures, *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, Springer, p.3-10
- Hawser, S.P., Douglas, L.J., 1994, Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*, *Infection and Immunity*, 62, p.915-921
- Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jhanke, B. vd., 2001, Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), p.2982-2992
- Hornby, J.M., Kebaara, B.W., Nickerson, K.W., 2003, Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid b, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(7), p.2366- 2369
- Hornby, J.M., Nickerson, K.W., 2004, Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treatment with four azoles, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6), p.2305-2307
- Houdt, R.V., Michiels, C.W., 2005, Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation, *Research in Microbiology*, 156, p.626-633
- Hösükoğlu, F.G., 2017, Vaginal örneklerden izole edilen *Candida*'ların tiplendirilmesi ve broth mikrodilüsyon yöntemi ile antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 88s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- İset, Ş., 2016, Çeşitli gıda örneklerinden izole edilen *Salmonella* ve *Listeria monocytogenes* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin araştırılması ve elektron mikroskopik tekniklerle değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı, 51s.
- Jabra-Rizk, M.A., Meiller, T.F., James, C.E., Shirtliff, M.E., 2006, Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), p.1463-1469
- Johnson, C.J., Cabezas-olcoz, J., Kernien, J.F., Wang, S.X., Beebe, D.J. vd., 2016, The extracellular matrix of *Candida albicans* biofilms impairs formation of neutrophil extracellular traps, *PLOS Pathogens*,12(9)
- Kaya, O., 2019, Yoğun bakım hastalarında kandida enfeksiyonları, Türkiye Klinikleri Kandida Enfeksiyonları, 1. Baskı, s.56-60
- Koç, A.N., 2007, Mikozların laboratuvar tanısı, etken mantarın tür tanısı ve antifungal direnç analizinde moleküler yöntemlerin yeri, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, İzmir, s.165-172
- Kutlu, M., 2019, İnteraabdominal kandida enfeksiyonları, Türkiye Klinikleri Kandida Enfeksiyonları, 1. Baskı, s.30-36
- Langford, M.L., Hasim, S., Nickerson, K.W., Atkin, A.L., 2010, Activity and toxicity of farnesol towards *Candida albicans* are dependent on growth conditions, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(2), p.940-942
- Larone, D.H., 1995, Medically important fungi: a guide to identification, 3.basım, ASM press, Washington D.
- Leonhardt, I., Spielberg, S., Weber, M., Albrecht-Eckardt, D., Blass, M. vd., 2015, The fungal quorum sensing molecule farnesol activates innate immune cells but supresses cellular adaptive immunity, *mBio*, 6(2)
- Madhavan, P., Jamal, F., Chong, P.P., 2011, Laboratory isolation and identification of *Candida* species, *Journal of Applied Sciences*, 11(16), p.2870-2877
- Mah, T.F.C., O'Toole,G.A., 2001, Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *Trends in Microbiology*, 9(1), p.34-39
- Malayeri, F.A., Rezaei, A.A., Raiesi, O., 2018, Antifungal agents: polyene, azole, antimetabolite, other and future agents, *Journal of Basic Research in Medical Science*, 5(2), p.48-55

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Martins, M., Henriques, M., Azeredo, J., Rocha, S.M., Coimbra, M.A. vd., 2007, Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candia dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells, *Eukaryotic Cell*, 6(12), p.2429-2436
- Mayalı, H., 2019, Oküler kandida enfeksiyonları, Türkiye Klinikleri Kandida Enfeksiyonları, 1. Baskı, s.25-29
- Mayer, F.L., Wilson, D., Hube, B., 2013, *Candida albicans* pathogenicity mechanisms, *Virulence*, 4(2), p.119-128
- Mishra, N.N., Tulika, P., Sharma, N., Payasi, A., Prasad, R. vd., 2007, Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 54(3), p.201-235
- Naranjo-Ortiz, M.A., Gabaldon T., 2019, Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi, *Biological Reviews*, 94, p. 2101-2137
- Nickerson, K., Atkin, A.L., Hornby, J.M., 2006, Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), p.3805-3813
- Ortega, M., Marco, F., Soriano, A., Almela, M., Martinez, J.A., vd., 2010, *Candida Spp.* bloodstream infection: influence of antifungal treatment on outcome, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, p.562-568
- Ortega, M., Marco, F., Soriano, A., Almela, M., Martinez, J.A. vd., 2011, *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in single institotion from 1991 to 2008, *Journal of Hospital Infection*, 77, p.157-161
- Özhak, B., 2019, Kandida enfeksiyonlarında kültür ve antifungal duyarlılık testleri, Türkiye Klinikleri Kandida Enfeksiyonları, 1. Baskı, s.61-67
- Özkütük, A., 2007, Mantarlarda quorum sensing molekülleri ve biyofilmler, *İnfeksiyon Dergisi*, 21, s.47-54
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Gibbs, D.L., Newell, V.A., Nagy, E. vd., 2008, *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the artemis disk antifungal surveillance program, 2001 to 2005, *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), p.515-521
- Polke, M., Sprenger, M., Scherlach, K., Alban-Proano, M.C., Martin, R. vd., 2017, A functional link between hyphal maintenance and quorum sensing in *Candida albicans*, *Molecular Microbiology*, 103(4), p.595-617

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ramage, G., Saville, S.P., Wickes, B.L., Lo'pez-Ribot, J.L., 2002, Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol: a quorum-sensing molecule, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), p.5459- 5463
- Ramage, G., Saville, S.P., Thomas, D.P., Lo'pez-Ribot, J., 2005, *Candida* biofilms: an update, *Eukaryotic Cell*, 4(4), p.633-638
- Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., Williams, C., 2012, Fungal biofilm resistance, *International Journal of Microbiology*
- Rüchel, R., Böning, B., Borg, M., 1986, Characterization of a secretory proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the absence of the enzyme during infection *in vitro*, *Infection and Immunity*, 53(2), p.411-419
- Samanta, I., 2015, *Veterinary Mycology*, Springer, p.3-8
- Sanguinetti, M., Posteraro, B., Lass-Flörl, C., 2015, Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact, *Mycoses*, 58(2), p.2-13
- Saraçlı, M.A., 2006, "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor?, *Gülhane Tıp Dergisi*, 48, s.244-250
- Sardi, J.C.O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco- Almeida, A.M., Mendes Gianni, M.J.S., 2013, *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options, *Journal of Medical Microbiology*, 62, p.10-24
- Sayın Kutlu, S., 2019, Santral Sinir Sistemi Kandida Enfeksiyonları, *Türkiye Klinikleri Kandida Enfeksiyonları*, 1. Baskı, s.19-24
- Semighini, C.P., Murray, N., Harris, S.D., 2008, Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and development by farnesol, *FEMS Microbiology Letters*, 279, p.259-264
- Sharma, R., Jangid, K., 2017, Role of quorum sensing in fungal morphogenesis and pathogenesis, *Springer*, p.105-132
- Singh, G., Raksha, Urkear, A. D., 2013, *Candidal* infection: epidemiology, pathogenesis and recent advances for diagnosis, *Bulletin of Pharmaceutical and Medical Sciences*,1(1)
- Spampinato, C., Leonardi, D., 2013, *Candida* infections, causes, targets and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents, *BioMed Research International*, 2013

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Spettel, K., Barousch, W., Makristathis, Zeller, I., Nehr, M. vd., 2019, Analysis of antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata* using next generation sequencing, Plos One, 14(1)
- Subhadra, B., Kim, D.H., Woo, K., Surendran, S., Choi, C.H., 2018, Control of biofilm formation in healthcare: recent advances exploiting quorum sensing interferences strategies and multidrug efflux pump inhibitors, Materials, 11(1676),
- Susever, S., Yeğenoğlu, Y., 2011, İnvazif mantar enfeksiyonlarının tanımlanmasında moleküler yöntemlerin öneminin konvansiyonel yöntemleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi, Mikrobiyoloji Bülteni, 45(2), s.325-335
- Şimşek, B., 2018, Trombositlerin *Candida albicans* üzerine antifungal etkinliğinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 92s
- Taff, H.T., Mitchell, K., Edward, J.A., Andes, D.R., 2013, Mechanism of *Candida* biofilm drug resistance, Future Microbiology, 8(10)
- Thompson, D.S., Carlisle, P.L., Kadosh, D., 2011, Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species, Eukaryotic Cell, 10(9), p.1173-1182
- Turhan, Ö., 2019, Osteoartiküler kandida enfeksiyonları, Türkiye Klinikleri Kandida Enfeksiyonları, 1. Baskı, s.53-55
- Turner, S.A., Butler, G., 2014, The *Candida* pathogenic species complex, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine,
- Trofa, D., Gacser, A., Nosanchuk, J.D., 2008, *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen, Clinical Microbiology Reviews, 21(4), p.606-625
- Weber, K., Schulz, B., Ruhnke, M., 2010, The quorum-sensing molecule E,E-farnesol-its variable secretion and its impact on the growth and metabolism of *Candida* species, Yeast, 27, p.727-739
- Whaley, S.G., Berkow, E.L., Rybak, J.M., Nishimoto, A.T., Barker, K.S. vd., 2017, Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species, Frontiers in Microbiology, 7
- Wiederhold, N.P., 2017, Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat, Infection and Drug Resistance, 10, p.249-259
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W.C., Camara, M., 2007, Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world, Philosophical Transactions of the Royal Society, 362, p.119-1134

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yüksekkaya, Ş., 2009, Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların idrarlarından izole edilen *Candida* türlerinin moleküler epidemiyolojisi ve antifungal duyarlılıkları, Uzmanlık Tezi, T.C. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 67s

Zuza- Alves, D.L., Silva-Rocha, W.P., Chaves, G.M., 2017, An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches, *Frontiers in Microbiology*, 8