



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**TRICHOSPORON ASAHİİ'DE SENTEZLENEN ENZİMLERİN BİYOFİLM OLUŞUMUNA
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ ve ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

Sinem AYAZ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sevgi ERGİN**

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Mikrobiyoloji, Doktora Programı

Kasım, 2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER.....	ii
TEZ KABUL VE ONAYI	vii
BEYAN	vii
BÜTÇE DESTEKLERİ.....	ix
TEŞEKKÜR.....	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xiii
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE.....	3
2.1. TRICHOSPORON ASAHII.....	3
2.1.1. Tarihçe ve Sınıflandırma.....	3
2.1.2. Genel Özellikler.....	3
2.1.3. Epidemiyoloji.....	4
2.1.4. Virulans Özellikleri.....	5
2.2. BİYOFİLM OLUŞTURMA.....	6
2.2.1. Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesinde Kullanılan Yöntemler.....	7
2.2.1.1. Modifiye Tüp Adherans Yöntemi.....	8
2.2.1.2. Kristal Viyole Yöntemi.....	8
2.2.1.3. XTT redüksiyon yöntemi.....	9
2.2.2. Trichosporon asahii ve Biyofilm.....	9
2.2.3. Biyofilm Oluşumu Sırasında Sentezlenen Enzimler.....	9
2.2.3.1. GAPDH Enzimi.....	10
2.3. TRICHOSPORON ASAHII VE ANTİFUNGAL İLAÇLAR.....	10

3. YÖNTEM	13
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN KÖKENLER VE GEREÇLER.....	13
3.1.1. Hasta Kökenleri ve Referans Kökenler.....	13
3.1.2. Besiyerleri.....	13
3.1.3. Kimyasal Maddeler, Antifungal İlaçlar ve Antikor.....	14
3.1.4. Filtreler ve Sarf Malzemeler.....	14
3.1.5. Kullanılan Ticari Kitler	15
3.1.6. Araçlar ve Aygıtlar	15
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN KÖKENLERİN ÜRETİLMESİ.....	16
3.3. BİYOFİLM OLUŞUMU.....	16
3.3.1. Biyofilm Oluşumunun Optimizasyonu.....	16
3.3.2. Kökenlerde Optimize Biyofilm Oluşumunun Sağlanması.....	16
3.3.3. Kökenlerde Biyofilm Oluşumunun Kristal Viyole Yöntemi ile Tayini.....	17
3.4. GAPDH MİKTARI TAYİNİ.....	17
3.4.1. Protein İzolasyonu.....	17
3.4.2. Protein Miktarının Bradford Yöntemi ile Belirlenmesi.....	18
3.4.3. Proteinlerin Denatüre Edilmesi.....	18
3.4.4. SDS-PAGE Jel Elektrophorezi.....	18
3.4.5. Western Blot Yöntemi.....	19
3.5. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ.....	20
3.5.1. Antifungallerin Seri Sulandırımalarının Hazırlanması.....	20
3.5.2. Planktonik Hücrelerin Antifungal Profilinin Belirlenmesi.....	20
3.5.3. Biyofilm Oluşumu Sonrası Hücrelerin Antifungal Profilinin Belirlenmesi.....	21
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	21
4. BULGULAR.....	23
4.1. OPTİMİZE BİYOFİLM OLUŞUMU YÖNTEMİNİN BELİRLENMESİ.....	23
4.2. BİYOFİLM DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ.....	25
4.3. WESTERN BLOT SONUÇLARI.....	27
4.4. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTİ SONUÇLARI.....	29
4.5. KLİNİK ÖRNEKLERE GÖRE İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	33
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41

KAYNAKLAR.....	43
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	49
ETİK KURUL İZİN YAZISI.....	50
KURUM İZNİ YAZILARI.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	52



TEZ KABUL VE ONAYI

Sinem AYAZ tarafından, **Prof. Dr. Sevgi ERGİN** danışmanlığında hazırlanan **"TRICHOSPORON ASAHİ'DE SENTEZLENEN ENZİMLERİN BİYOFİLM OLUŞUMUNA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ ve ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI"** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi		İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Sevgi ERGİN		
	İstanbul Üniversitesi-		
	Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp		☒
	Fakültesi		Kabul
	Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim		☐
	Dalı		Ret
ÜYE	Prof. Dr. Gökhan AYGÜN		
	İstanbul Üniversitesi-		
	Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp		☒
	Fakültesi		Kabul
	Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim		☐
	Dalı		Ret
ÜYE	Prof. Dr. Kemal ALTAŞ		
	Haliç Üniversitesi, Tıp		
	Fakültesi		☒
	Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim		Kabul
	Dalı		☐
			Ret

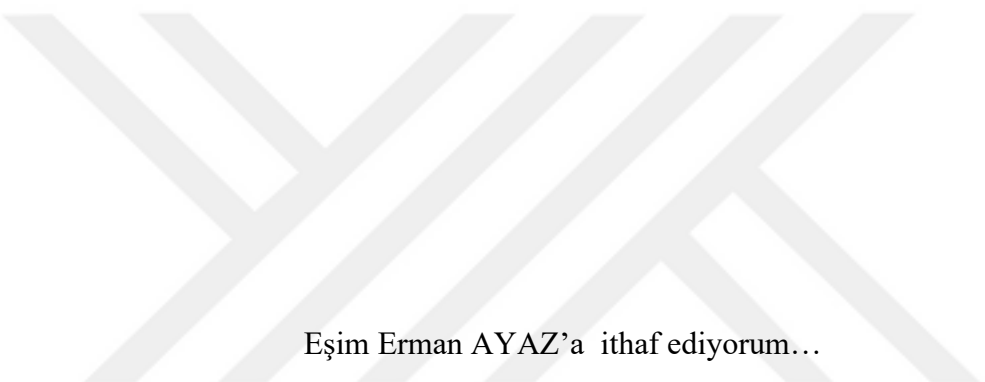
ÜYE	Doç. Dr. Harika Öykü DİNÇ	
	Üsküdar Üniversitesi, Tıp	☒
	Fakültesi	Kabul
	Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	☐ Ret
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Sevinç BABA	
	İstanbul Gelişim Üniversitesi,	☒
	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Kabul
	Beslenme ve Diyetetik Bölümü	☐ Ret

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Sinem AYAZ

(İmza)



Eşim Erman AYAZ'a ithaf ediyorum...

BÜTÇE DESTEKLERİ

**TRICHOSPORON ASAHİİ'DE SENTEZLENEN ENZİMLERİN BİYOFİLM OLUŞUMUNA ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ ve ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TDK-2022-36238



TEŞEKKÜR

Tezimde beni yalnız bırakmayan, her türlü yardımını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Sevgi ERGİN'e,

Doktora eğitim sürecimde katkısı olan Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI'ya, doktora bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görevli tüm hocalarıma,

Tez jürimde bulunan ve desteklerini esirgemeyen kıymetli hocalarım; Prof. Dr. Kemal ALTAŞ, Prof. Dr. Gökhan AYGÜN'e ve yakın zamanda kaybettiğimiz Sayın Prof. Dr. Kenan MİDİLLİ'ye ve akademik hayatımda kendisinden birçok şey öğrendiğim hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Fulya DAL YÖNTEM'e,

Her an ve her koşulda yanımda olan sevgili eşim, Erman AYAZ'a ve beni bu yaşıma kadar yetiştiren babam Fevzi KARABULUT'a, annem Meryem KARABULUT'a ve kardeşim Sinan KARABULUT'a sonsuz teşekkürlerimle,

Ayrıca bu tezi, TDK-2022-36238 proje numarasıyla destekleyen İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimle...

Kasım 2024

Sinem AYAZ

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 4.1:** A. 2017 yılında izole edilen hasta kökeninin 10^7 hücre/mL, 60, 90 ve 120 dk adezyon süresi, 72 saat inkübasyon ve statik koşullarda yapılan iki deneyin sonuçları, B. 2019 yılında izole edilen hasta kökeninin 10^7 hücre/mL, 60, 90 ve 120 dk adezyon süresi, 72 saat inkübasyon ve statik koşullarda yapılan iki deneyin sonuçları, C. *T. asahii* var. *asahii* CBS 2479 referans kökeninin 10^7 hücre/mL, 60, 90 ve 120 dk adezyon süresi, 72 saat inkübasyon ve statik koşullarda yapılan iki deneyin sonuçları.....26
- Şekil 4.2:** Otuz adet *T. asahii* hasta kökeni ve üç adet referans kökeninin biyofilm oluşumunun kristal viyole yöntemi ile belirlenen absorbands değerleri.....27
- Şekil 4.3:** Otuz adet *T. asahii* hasta kökeninin biyofilm oluşumunun kristal viyole yöntemi ile belirlenen absorbands değerlerine göre düşük (n=6), orta (n=12) ve yüksek (n=12) biyofilm düzeyi olarak kategorilere ayrılması.....28
- Şekil 4.4:** Çalışmaya dahil olan otuz adet hasta suşunun western blotta saptanan GAPDH protein bantları. (37 kDa kullanılan standart proteinde işaretli olan molekül ağırlığıdır.).....29
- Şekil 4.5:** Otuz adet *T. asahii* hasta kökeninin biyofilm düzeylerinin absorbands değerleri ile GAPDH düzeylerinin yüzdesinin karşılaştırılması [Pearson korelasyonu $r=0,7058$ (%71), $p<0,0001$, $R^2=0,498$.].....30
- Şekil 4.6:** Hasta kökenlerinde planktonik hücrelerdeki antifungal MİK değerleri ve biyofilm oluşturmuş hücrelerdeki MBEK80 değerleri arasındaki $\log_2$ 'lerinin yüzdelik oranları **A.** AMB için $\log_2$, **B.** FLC için $\log_2$, **C.** POS için $\log_2$ 33

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1: Kullanılan 2 hasta kökeni ve referans kökeninde iki deney arasında en az fark olan parametreler.....	25
Tablo 4.2: Tüm hasta kökenlerinin AMB, FLC ve POS'a karşı hem planktonik hücre olarak MİK değerleri ve hem de biyofilm oluşumları sağlandıktan sonra MBEK50 ve MBEK80 değerleri.....	31
Tablo 4.3: Tüm hasta kökenleri ve biyofilm düzeylerine göre ayrılmış grupların planktonik hücre ve biyofilm oluşturmuş hücre olarak üç antifungale karşı <i>in vitro</i> aktivitelerinin MİK ve MBEK80 değerlerinin karşılaştırılması.....	32
Tablo 4.4: Tüm kökenlerin üç antifungale karşı planktonik ve biyofilm oluşturan hücreler arasındaki MİK log ₂ düzeyleri ile biyofilm düzeyleri ve GAPDH düzeylerinin Pearson Korelasyon analizi ile karşılaştırılması.....	34
Tablo 4.5: Numune türüne göre, yüzeyel, diğer ve idrar kökenleri olarak ayrılan üç grubun; biyofilm düzeyleri (O.D.), GAPDH düzeyleri (alan) ve üç antifungalın (AMB, FLC ve POS) MİK değerleri, MBEK80 değerleri ve bu ikisi arasındaki log ₂ değerlerine göre ayrı ayrı yapılan Tukey testleri sonucu elde edilen p değerlerinin gösterilmesi.....	35

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	: Celcius derece
A ₅₇₀	: 570 nm'deki absorbans değeri
dk	: Dakika
kDa	: Kilodalton
mL	: Mililitre
μL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
μg	: Mikrogram
nm	: Nanometre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
M	: Molar
n	: Sayı
rpm	: Dakikadaki devir sayısı

Kısaltmalar	Açıklama
AMB	: Amfoterisin B
AIDS	: Edinilmiş immün yetmezlik sendromu
BSA	: Sığır Serum Albumin
<i>T. asahii</i>	: <i>Trichosporon asahii</i>
<i>C. albicans</i>	: <i>Candida albicans</i>
DMSO	: Dimetil sülfoksit
FLC	: Flukonazol
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GM	: Geometrik ortalama
GXM	: Glukuronoksilomannan
HRP	: Bayır turpu peroksidazı
IGS	: İntergenik bölge

ITS	: İnternal transkripsiyon bölgesi
log₂	: Logaritmik artış
MBEK50	: Minimal biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (Üremenin en az %50sinin inhibe olduğu konsantrasyon)
MBEK80	: Minimal biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (Üremenin en az %80inin inhibe olduğu konsantrasyon)
MİK	: Minimal inhibisyon konsantrasyonu
MİK₅₀	: Tüm kökenlerin en az %50'sinin MİK değeri
MİK₉₀	: Tüm kökenlerin en az %90'ının MİK değeri
MOPS	: 3-(N-morfolino) propan sülfonik asit
O.D.	: Optik densite
PBS	: Fosfat tamponlu salin
Pearson r	: Pearson korelasyon değeri
POS	: Posakonazol
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
SDA	: Sabouraud dekstroza agar
SDB	: Saboroud Dekstroza Agar
SDS	: Sodyum dodekil sülfat
T	: Tween 20
VOR	: Vorikonazol
XTT	: 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid

ÖZET

DOKTORA TEZİ

TRICHOSPORON ASAHİİ'DE SENTEZLENEN ENZİMLERİN BİYOFİLM OLUŞUMUNA ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ ve ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Sinem AYZ

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Mikrobiyoloji, Doktora Programı

Danışman : Prof. Dr. Sevgi ERGİN

Giriş ve Amaç: Son yıllarda, özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda, invaziv trikosporonozun en sık nedeni olarak karşımıza çıkan *Trichosporon asahii*'nin en önemli virülans faktörlerinden biri biyofilm oluşumu olup, antifungallere ve çevreye karşı direnç oluşturmaktadır. Bu çalışmada amacımız *T. asahii*'de biyofilm oluşumunun mekanizmasını aydınlatmak, biyofilm oluşumu sürecinde sentezlediği enzimlerden gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enziminin biyofilm oluşumuna katkısını belirlemek ve biyofilm ile antifungal duyarlılık profilleri arasında ilişki olup olmadığını saptamaktır.

Yöntem ve Bulgular: Çalışmaya 30 adet hasta kökeni dahil edildi. Biyofilm oluşumunu belirlemek için kristal viyole yöntemi kullanıldı ve öncelikle yöntem optimize edildi, daha sonra kökenlerin biyofilm düzeyleri düşük, orta ve yüksek biyofilm oluşturanlar şeklinde gruplandırıldı. Kökenlerin sentezlediği GAPDH miktarları Western-Blot yöntemi ile belirlendi. Kökenlerin amfoterisin B, flukonazol ve posakonazole karşı antifungal duyarlılık profilleri, planktonik hücreler için CLSI-M27-A3 rehberine göre, biyofilm oluşumunda ise XTT redüksiyon yöntemiyle belirlendi. Biyofilm oluşumu, GAPDH üretimi ve antifungal duyarlılık profilleri arasında Mann-Witney U, Kruskal Wallis, tek yönlü ANOVA testleri ve Pearson Korelasyon analizi kullanılarak yapılan istatistiksel analizlerle korelasyon varlığı araştırıldı.

Sonuçlar: Çalışmamızda kökenlerin biyofilm düzeyleri arttıkça, GAPDH düzeylerinin arttığı ve kökenlerin düşük, orta ve yüksek düzey biyofilm oluşumlarının GAPDH miktarları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Antifungal duyarlılık testlerinde biyofilm oluşturan hücrelerin, planktonik hücrelere göre daha yüksek MİK değerleri (MİK50,

MİK90 ve GM) olduğu belirlendi. Literatürde incelediğimiz kadarıyla *T. asahii*'de, biyofilm oluşumunda, posakonazol MİK sonuçlarını inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlayamadık ve dolayısıyla gerçekleştirdiğimiz çalışma dünyada ve Türkiye'de ilk çalışmadır. Kökenlerin %73,33'ünde POS MİK'inde logaritmik artışın $14 \geq \log_2 \geq 10$ olduğu görüldü. Ayrıca yüksek POS MİK sonuçları biyofilm oluşturan *T. asahii* enfeksiyonlarının tedavisinde POS'un kullanımının kısıtlandığını göstermekteydi. Planktonik hücre ve biyofilm oluşturan hücre arasındaki antifungal MİK $\log_2$ değerleri ile biyofilm düzeyleri ve GAPDH miktarları arasında anlamlı bir korelasyon olmadığı belirlendi. Bu durum, biyofilm oluşumundaki MİK değerlerindeki artışın sadece GAPDH enzimindeki artıştan kaynaklanmadığını ve başka etkenler de olabileceğini göstermekteydi. Ayrıca numune türünün biyofilm oluşumuna etkisinin olmadığı da görüldü. İnceleyebildiğimiz kadarıyla bu çalışma sırasında ilk kez belirlediğimiz optimize *T. asahii* biyofilm oluşumu yönteminin de ülkemizde yapılacak olan daha sonraki çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz. |

Kasım 2024 , 70 sayfa.

Anahtar kelimeler: | *Trichosporon asahii*, Biyofilm, Antifungal Duyarlılık |

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TDK-2022-36238

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

DETERMINATION of the EFFECT of ENZYMES SYNTHESIZED in TRICHOSPORON ASAHII on BIOFILM FORMATION and COMPARISON of THEIR ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY

Sinem AYAZ

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Microbiology

Medical Microbiology, Ph.D. Programme

Supervisor : Prof. Dr. Sevgi ERGİN

Introduction and Aim: In recent years, *Trichosporon asahii* has emerged as the most common cause of invasive trichosporonosis, especially in immunocompromised patients. One of the most important virulence factors of *Trichosporon asahii* is biofilm formation, which creates resistance to antifungals and the environment. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of biofilm formation in *T. asahii*, to determine the contribution of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enzyme, one of the enzymes synthesized during the biofilm formation process, to biofilm formation, and to determine whether there is a relationship between biofilm and antifungal susceptibility profiles.

Material and Methods: Thirty patient isolates were included in the study. Crystal violet method was used to determine biofilm formation and firstly the method was optimized, then the biofilm levels of the isolates were grouped as low, medium and high biofilm forming. The amounts of GAPDH synthesized by the isolates were determined by Western-Blot method. Antifungal susceptibility profiles of the isolates against amphotericin B, fluconazole and posaconazole were determined according to CLSI-M27-A3 guideline for planktonic cells and by XTT reduction method for biofilm formation. The existence of correlation between biofilm formation, GAPDH production and antifungal susceptibility profiles was investigated by statistical analyses using Mann-Witney U, Kruskal Wallis, one-way ANOVA tests and Pearson Correlation analysis.

Conclusions: In our study, it was observed that as the biofilm levels of the strains increased, the GAPDH levels increased and the difference between the GAPDH amounts of the low, medium and high level biofilm formations of the strains was statistically significant. In antifungal susceptibility tests, it was determined that the biofilm-forming cells had higher MIC values (MIC₅₀, MIC₉₀ and GM) than the planktonic cells. As far as we examined in the literature, we could not find any study examining the MIC results of posaconazole in biofilm formation in *T. asahii* and therefore our study is the first study in the world and in Turkey. It was seen that the logarithmic increase in POS MIC was $14 \geq \log_2 \geq 10$ in 73.33% of the strains. In addition, high POS MIC results showed that the use of POS in the treatment of biofilm-forming *T. asahii* infections was narrowed. It was determined that there was no significant correlation between the antifungal MIC log₂ values between planktonic and biofilm-forming cells and biofilm levels and GAPDH amounts. This situation showed that the increase in MIC values in biofilm formation was not only due to the increase in GAPDH enzyme and there may be other factors. It was also seen that the sample type had no effect on biofilm formation. As far as we could examine, we believe that the optimized *T. asahii* biofilm formation method that we determined for the first time in our country during this study will also shed light on future studies.

November 2024, 70 pages.

Keywords: *Trichosporon asahii*, Biofilm, Antifungal Susceptibility

This study was funded by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University-Cerrahpasa Rectorate. Project number TDK-2022-36238

1. GİRİŞ

Trichosporon asahii (*T. asahii*), doğada ve insan mikrobiyotasında bulunabilen, yüzeyel ve invaziv enfeksiyonlara yol açabilen bir etkindir. Ayrıca trikosporonozun de en sık karşılaşılan etkenidir. Özellikle immün yetmezlikli hastalarda %50-80 arasında mortalite oranına sahiptir ve ciddi invaziv enfeksiyonlara neden olabilen Basidiyomiset mayalardandır. Vücudunda kateter ve prostetik materyal bulunan hastalarda trikosporonoz bu yüzeylerde biyofilm oluşturabilmektedir [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

Biyofilm oluşumu, *T. asahii*'nin en önemli virülans özelliklerinden biridir. Biyofilm oluşumunda, mikroorganizmanın canlı veya cansız bir yüzeye adezyonu ve daha sonra kolonizasyonu olmaktadır. *T. asahii* adezyon sırasında maya formundayken, kolonizasyon sırasında filamentöz forma geçer ki bu dimorfizmde virülansında son derece önemlidir; ayrıca maya, hif ve artrokonidya formları aynı anda biyofilmde bulunabilmektedir [1, 2, 3, 5, 6, 7]. Biyofilm yapısı, mikroorganizma agregatları ve ekstrasellüler matriksten oluşmaktadır. Bu yapı bağışıklık sisteminden kaçış ve antifungallere yüksek oranda direnç göstermesi nedeniyle de önemli bir virülans özelliğidir. İnvaziv girişimler sonrasında vücuda yerleştirilmiş kateter, protez, ortez vb yapılarda biyofilm oluştuğunda tedavisi oldukça zor olup, antifungal direnç dolayısıyla tedavide antifungal kullanılamamakta ve mutlaka cerrahi olarak materyalin çıkartılması gerekmektedir. Bu tür bir cerrahi girişim, ağır hastalarda klinik sorun yaratmaktadır [1, 5].

Bakteri ve mantar hücre duvarı dış yüzeyinde, nükleusta ve sitoplazmada gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) enzimi bulunmaktadır. Ayrıca GAPDH enzimi, hücre içinde glikolitik yolda rol oynayarak hücre yüzeyinde modifiye olabilmekte ve adezyon molekülü olarak da görev alabilmekte ve mikroorganizmanın patogeneze katkı sağlamaktadır. *T. asahii* de GAPDH enzimini eksprese etmektedir, fakat biyofilm oluşumuna ne kadar katkı sağladığı henüz tam olarak açıklanamamıştır [3].

Ayrıca *T. asahii*, ekinokandinlere doğal dirençli iken, amfoterisin B (AMB)'ye karşı yüksek minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK)'na sahip suşları bulunmaktadır. Azollere duyarlı iken, son yıllarda maalesef bu gruba karşı da yüksek MİK değerlerine sahip kökenlerin

varlığı ortaya konmuştur. Mantarın biyofilm oluşturan suşlarında ise hem AMB ve hem de azollere duyarlılığın azaldığını bildiren çalışmalar mevcuttur [2, 4, 8, 9].

Trichosporon asahii'de *in vitro* biyofilm oluşumunun araştırılmasında altın standart yöntem bulunmamaktadır. Bu nedenle biyofilm oluşumu sırasında, en optimize inokulum miktarı, adezyon süresi, biyofilm olgunlaşma süresi ve ortamı belirlemek için optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır.

Deneysel olarak kurgulanan ve daha önceden referans *T. asahii* kökeninde ve iki hasta kökeninde biyofilm oluşumunda optimizasyon süreci belirlenerek gerçekleştirilen bu çalışmada, 2014-2019 yılları arasında apse, el-ayak tırnağı, deri kazıntısı, dren sıvısı, idrar ve kan örneklerinden izole edilip MALDI-TOF MS yöntemiyle tanımlanmış olan 30 adet *T. asahii* kökeninin ürettiği GAPDH enziminin biyofilm oluşumuna katkısının belirlenmesi, biyofilm oluşumunun mantar antifungal duyarlılığı üzerindeki etkisinin araştırılması ve ayrıca GAPDH, biyofilm ve antifungal duyarlılık düzeylerinin korelasyonunun ortaya konulması amaçlandı.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. *TRICHOSPORON ASAHII*

2.1.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

Trichosporon kelimesi Yunanca saç anlamına gelen “Trichos” ve spor anlamına gelen “sporon” kelimesinden köken almıştır. *Trichosporon* cinsi, ilk kez Beigel tarafından 1865 yılında iyi huylu saç shaftı enfeksiyonu yani beyaz piedra etkeni olarak izole edilmiştir [7, 10]. 1902 yılında Vuillemin *Trichosporon* türlerinin tamamını artrokonidyumlu maya olarak tanımlamış ve *Trichosporon beigelii* olarak isimlendirmiştir [7]. 1970 yılında ise etken ilk kez invaziv trikosporoz etkeni olarak beyinden izole edilmiştir [2, 7].

Gueho ve ark. [11], *Trichosporon* cinsini, ilk kez, moleküler, biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik özelliklerine göre taksonomik olarak sınıflandırılmıştır. Bu literatüre göre yeni geliştirilen tekniklerle *Trichosporon asahii* taksonu belirlenmiştir. Daha önce sistemik enfeksiyonda *T. beigelii* olarak bildirilen izolatların artık *T. asahii*'ye ait olduğu bildirilmiştir [11]. 2004 yılında *Trichosporon* cinsinin Brassicae, Cutaneum, Gracile, Ovoides, Porosum kümelerinden oluştuğu gösterilmiştir [7]. Günümüzde 50'den fazla farklı alt tür olduğu ve yaklaşık 16 farklı suşun insanlarda enfeksiyona neden olduğu bilinmektedir [10].

2.1.2. Genel Özellikler

Trichosporon türleri, sarımtırak beyaz veya krem renkli, yumuşak, parlak, nemli, kabarık koloniler oluşturur. Koloni eskidikçe düzgünden buruşuğa kadar değişen, yüzeyinde düzensiz kıvrımlar oluşan, kireç görünümlü kolonilere dönüşebilir [7, 12, 13]. *T. asahii*'de morfolojik varyasyonlarla farklı koloni tipleri oluşmaktadır [3]. Ichikawa ve ark. [3]'nın yaptıkları çalışmada üç kökende beyaz-tüylü, kirli beyaz-pürüzsüz, kirli beyaz-buruşuk, pürüzsüz ve sarımsı beyaz şeklinde beş farklı fenotip belirlenmiştir.

Koloniler Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) ve patates dekstroz agarda, 3-7 günde, 25-40°C sıcaklıkta olgunlaşabilmektedir, en optimal üreme ısısı ise 30°C'dir. Mikroskopik olarak;

blastospor, artrokonidya, hiyalen septalı hifler veya yalancı hifler bir arada gözlenebilmektedir [7, 12, 13].

Trichosporon türlerinde, üreaz enzimi üretimi tipiktir ve dekstroz, laktoz, ksiloz, inozitol, L-arabinoz ve L-ramnozu asimile edebilirler, fakat, potasyum ve nitratı asimile edemez ve karbonhidratları fermente edemezler [7, 12, 13].

2.1.3. Epidemiyoloji

Trichosporon cinsi Basidiyomiset mayalarından olup maya benzeri anamorfik mikroorganizmalardır [10]. İnsanda, deri, vajina, tırnak, gastrointestinal sistem ve solunum sistemi mikrobiyotasında bulunabilen, kolonize olabilen ve çoğalabilen maya benzeri mantar cinsidir. Bu etken ile meydana gelen enfeksiyonların kaynağı genelde endojendir. Doğada coğrafik olarak geniş bir dağılım gösterdiği gibi özellikle sıcak ve tropikal bölgelerde daha sık karşılaşılmaktadır. Toprak, nehir, göl, deniz suyu, çürüyen maddeler, ayrıştırılmış ahşap, peynir gibi yiyecekler, böcekler, kuş, yarası ve sığır dışkılarından da izole edilebilmektedir [2, 4, 5, 7, 9, 10, 14]. Çevresel kökenlere nazaran klinik kökenlerin patojenitesinin daha yüksek olduğu ileri sürülmektedir [3, 5].

Trichosporon cinsi, hem beyaz piedra gibi kolaylıkla tedavi edilebilen yüzeysel enfeksiyonlara ve hem de yaygın ve invaziv trikosporonoza neden olabilmektedir [1, 2]. *T. asahii* ise mortalite oranı yüksek invaziv trikosporonozun en fazla görülen etkenidir [1, 2, 7, 15]. Biyofilm oluşturabildiği için tıbbi cihazlarla ilişkili enfeksiyonlara da neden olabilmektedir [1]. Santral venöz kateter yüzeyinde biyofilm oluşturarak kateter ile ilişkili damar yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır [1].

Trichosporon türleri ekinokandin tedavisi altında olan hastalarda önemli enfeksiyonlara sebep olabilmektedir [3]. *T. asahii* ise yaz tipi aşırı duyarlılık pnömonisine, yüzeysel enfeksiyonlara, pnömoni ve endokardit gibi fırsatçı sistemik enfeksiyonlara sebep olabilen *Trichosporon* türüdür [3, 5, 2]. *T. asahii* %50-90 mortalite oranına sahip invaziv trikosporonozun da en önemli etkenidir [1, 2, 5, 10, 16]. Özellikle lösemi, lenfoma ve multipl miyelom gibi hematoloji hastaları, edinilmiş immün yetmezlik sendromu (AIDS) ve kanser gibi immün yetmezliği olan hastalarda kandidadan sonra en sık görülen ikinci mantar türüdür [2, 5, 10]. Ayrıca santral venöz kateterli hastalarda nötropeni ile invaziv trikosporonoza sebep

olmaktadır ve bu fungemi kateter yüzeyinde biyofilm oluşumu ile antifungallere yüksek direnç göstermektedir [1, 2].

Trichosporon cinsi için serotip I, II, III ve I-III olarak dört serotip bildirilmiştir. *T. cutaneum* ve *T. mucoides* serotip I, *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. inkin* ve *T. ovoides* türleri serotip II olarak sınıflandırılmaktadır. Serotip III ve I-III ise patojenik olmayan *Trichosporon* türlerini içermektedir [13, 17, 18].

Klinik örneğin direkt mikroskopik incelenmesi, kültürde üretilen kolonilerin morfolojik ve mikroskopik incelenmesi ve asimilasyon testleri *T. asahii*'nin ön tanısı için önemlidir, ancak kütle spektrometresi veya moleküler yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir [4]. *T. asahii*'nin moleküler tanımlanması için 26S rDNA internal transkripsiyon bölgesi (ITS), D1/D2 ve intergenik bölge (IGS) kullanılmaktadır [4, 7, 13, 19]. *T. asahii* genomundaki 26S ve 5S ribozomal RNA arasındaki IGS 1 bölgesindeki farklılıklara dayanılarak *T. asahii* için 15 farklı genotip tanımlanmıştır ve genoepidemiolojik çalışmalar ile farklı coğrafyalarda farklı genotiplerin olduğu gösterilmiştir [4, 7, 19, 20]. *T. asahii*'nin epidemiolojik olarak dünyadaki genotip dağılımında; Japonya'da genotip 1, Amerika'da genotip 3 ve 5, İspanya'da ise genotip 1 ve 5'in en sık bulunduğu görülmektedir [7, 21, 22]. Kalkanci ve ark. [23]'ün ülkemizde 87 *T. asahii* kökeninde %79.3 oranında genotip 1 tespit etmiş; genotip 5, 3, 6, 4 ve 9'u ise sırasıyla %8, %6.9, %3.4, %1.1 ve %1.1 oranlarında saptamışlardır. Türkiye'deki bir diğer genotiplendirme çalışması olan Ayaz ve ark. [4]'ün yaptığı çalışmada ise; 70 *T. asahii* kökeninin %77,1'ini genotip 1 oluşturmakta olup, %17,1'i genotip 4, %2,9'ı genotip 3 ve yine %2,9'unu genotip 5 oluşturmaktadır. Yine aynı çalışmada genotip 4'ün son yıllarda görülme sıklığının önceki yıllara göre arttığı tespit edilmiştir [4].

2.1.4. Virulans Özellikleri

Trichosporon asahii'nin patojenitesi ve virulans faktörleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [2]. *T. asahii*'nin esteraz, hemolizin, lipaz, fosfolipaz, proteaz, koagülaz, katalaz, süperoksit dismutaz ve DNAz üretebildiği bildirilmiştir. Bu litik bileşiklerin, enfeksiyonun patogenezinde etkili olabileceği düşünülmekle birlikte patogenezdaki rolü ile ilgili olarak daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu bildirilmektedir [2, 5, 12, 24, 15]. Ichikawa ve ark. [25]'nin çalışmasında, 61 adet *T. asahii* kökeninde asit proteinaz ve fosfolipaz aktivitesi olmadığı ve ekstrasellüler enzim olan β -N-asetilheksozaminidaz aktivitesi varlığı belirlenmiştir. Türkiye'de yapılan Dag ve Cerikcioglu [14]'ün çalışmasında ise, 48 *T. asahii*

kökeninin esteraz ürettiği fakat asit proteinaz ve fosfolipaz üretmediği gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada kökenlerde farklı düzeylerde yüzey hidrofobisitesi ve biyofilm üretiminin olduğu belirlenmiştir [14].

Trichosporon asahii'de koloni morfolojisi ile fenotip değişiminin de patogeneze rolü olabileceği düşünülmekte olup, bu morfolojik farklılığın adezyonda etkili olduğu ileri sürülmektedir ve blastospordan hifal forma geçişin de yine önemli bir virulans faktör olduğu belirtilmiştir [3, 5]. Ayrıca Karashima ve ark. [26]'nın yapmış olduğu çalışmada, çevresel ve klinik *T. asahii* izolatlarının, farelerde, *in-vivo* olarak pasajlanması sonrasında, koloni şekilleri ve hücre tiplerinin morfolojik değişim gösterdiği ve klinik örneklerin çevresel örneklerle göre fenotipik değişimlerinin ve glukuronoksilomannan (GXM) salınımının önemli ölçüde farklı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada GXM antijeninin, mantarın polimorfonükleer lökosit ve monositlerin fagositozundan kaçmasını sağlayarak patogeneze önemli bir rol oynamasına sebep olduğu bildirilmektedir.

Hücre duvarındaki melanin pigmenti, oksitleyici ajanlara karşı direnç ve metabolik esnekliğin de yine *T. asahii*'nin önemli virülans faktörleri olduğu ifade edilmektedir [15].

Trichosporon asahii'de adezyon sonrasında biyofilm oluşumunun, özellikle kateter kullanımı gibi tıbbi uygulamalar sırasında invaziv enfeksiyonlara neden olması, trikosporonozun patojenitesinde biyofilmin önemli bir rol oynadığını göstermektedir [2, 27, 28, 29].

2.2. BİYOFİLM OLUŞTURMA

Bazı mikroorganizmalar polisakkarit, protein ve ekstrasellüler DNA'dan oluşabilen organik ve inorganik yüzeylere adezyonu sağlayabilen polimerik ekstrasellüler matriks üretebilmektedir. Bu matriks ile mikroorganizmalardan oluşan yapıya biyofilm adı verilmektedir [1, 2, 5]. Biyofilm, mikroorganizmaların büyüme, çoğalma ve kolonizasyonunu kolaylaştırmakta, ayrıca çevresel strese ve antimikrobiyal ilaçlara yüksek düzeyde direnç sağlamaktadır [2]. Bu nedenle özellikle yabancı cisim kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde tıbbi cihazın cerrahi olarak çıkartılması gerekmektedir [1]. Biyofilm oluşumu ve morfolojisi

arasındaki ilişkinin bilinmesi biyofilm ilişkili enfeksiyonların aydınlatılmasında ve tedavisinde önemli rol oynamaktadır [1].

Örneğin; *Candida albicans* biyofilm oluşumu sırasında çevresel uyaranlara cevap olarak maya formundan hif formuna geçmekte ve dolayısıyla morfolojik değişime uğramaktadır. Maya hücreleri öncelikle yüzeye adhere olmakta, daha sonra filamentasyon ile hifal hücreler ve ekstrasellüler matriks üretimi gerçekleşmektedir [1].

Örneğin; patojenik filamentöz bir mantar olan *Aspergillus* türleri biyofilm oluşumu sırasında konidilerden germinasyon ile hif oluşturur. Hidrofobik *Aspergillus* konidileri yüzeye adhere olur ve filamentasyonla hifal hücreler ve ekstrasellüler matriksi üretir. *Aspergillus* türlerinin biyofilm oluşturmada hidrofobisitesi ile ilişkilidir [1].

Trichosporon biyofilm yapısı da planktonik hücrelere göre, yüksek adhezyon yeteneği, yüksek hücre canlılığı ve yüksek antifungal ilaç direnci ile son derece özelliklidir [15].

Biyofilmler antifungallere intrinsek dirençli olabildiğinden son zamanlarda alternatif anti-biyofilm aktivitesine sahip bileşikler üzerinde durulmakta ve araştırılmaktadır [5]. Örneğin; *C. albicans*'ın yaptığı *quorum sensing*'in bir parçası olan farnesol, potansiyel bir antimikrobiyal ajandır [5]. Daha önceki çalışmalarda *Burkholderia pseudomallei*, *Staphylococcus* gibi bakterilerde, *Aspergillus flavus*, *Coccidioides posadasii*, *Sporothrix schenckii* ve *Histoplasma capsulatum*'da da farnesolün antimikrobiyal aktivitesinin olduğu gösterilmiştir [5]. Cordeiro ve ark. [5]'nın çalışmasında ise farnesolün *T. asahii* ve *Trichosporon inkin*'de filamentasyonu azalttığı gösterilmiştir. Farelerde yapılan deneysel çalışmalarda vulvovajinal kandidiyazın tedavisinde farnesolün etkili olduğu gösterilmiştir [30, 31].

2.2.1. Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesinde Kullanılan Yöntemler

Trichosporon asahii'de *in vitro* biyofilm oluşumunun araştırılmasında altın standart yöntem bulunmamaktadır. Bu nedenle biyofilm oluşumu sırasında, en optimize inokulum miktarı, adezyon süresi, biyofilm olgunlaşma süresi ve ortamı belirlemek için optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır [2, 9, 28].

Trichosporon asahii'de biyofilm oluşumunu belirlemek için modifiye tüp aderans yöntemi, kristal viyole yöntemi ve XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid) redüksiyon yöntemi kullanılmaktadır [14, 28, 32, 33].

2.2.1.1. Modifiye Tüp Adherans Yöntemi

Modifiye tüp adherans yöntemi ile biyofilm tespiti daha çok *Candida* türlerinde kullanılmış olup, diğer yöntemlere göre daha eski bir yöntemdir. Bu yöntemde, polistiren falkon tüp içerisinde inoküle edilen ve daha sonra 48 saat inkübe edilen hücreler sürenin sonunda safranin ile boyanarak, havada kurutulduktan sonra tüplerin iç çeperinde renkli ve tespit edilebilen film tabakası varlığına göre gözle biyofilm pozitifliği değerlendirilmektedir [14, 34].

2.2.1.2. Kristal Viyole Yöntemi

Kristal viyole boyası hücre içine alınarak hücrelerin boyanmasını sağlayan bir boyadır. Kristal viyole yönteminde, biyofilmdeki canlı ve cansız hücreler ayırt edilmeksizin hepsi boyanmaktadır. Daha sonra verilen etanol sayesinde hücre içine alınmış olan boya hücre dışına çıkarılarak spektrofotometrik olarak ölçümü yapılmakta ve optik densite (O.D.) belirlenmektedir [28, 32, 33]. Kolorimetrik sinyalin ölçülmesi ile belirlenen O.D. değerleri ile hücre sayısı arasında doğrudan ilişki bulunmaktadır. Fakat bu durum mantar türü ve kökenleri arasında farklılık gösterebilmektedir, dolayısıyla daha farklı tür ve kökenlerle, daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir [32].

2.2.1.3. XTT redüksiyon yöntemi

XTT redüksiyon yöntemi, sodyum 3'-[1-(fenilamino-karbonil)-3,4-tetrazolyum]-bis (4-metoksi-6-nitro) benzen sülfonik asit hidrat bazlı bir kolorimetrik analiz yöntemidir [28]. XTT, sarı tetrazolyum tuzu olup, hücrelere verildiğinde, canlı hücreler tarafından, hücre içine alındıktan sonra, mayada bulunan mitokondriyal süksinoksidaz ve sitokrom P450 sistemi ile suda çözünebilen turuncu renkli formazan boyasına dönüştürülür. Daha sonra bu renk değişimi düzeyi spektrofotometrik olarak ölçülür ve O.D. belirlenir. Bu metot ile metabolik olarak aktif olan hücrelerde biyofilm yapısı bozulmadan tespit edilebilmektedir. Yapısı bozulmamış biyofilmde ilaç duyarlılığı çalışmaları da mümkün olmaktadır. Son dönemde biyofilm oluşumunda ve antifungal duyarlılık tespitinde XTT redüksiyon testi daha sık kullanılır hale gelmiştir [32, 33]. Melo ve ark. [33]'nın yaptığı çalışmada, XTT redüksiyon metodunun, kristal viyole yöntemine göre daha duyarlı bir metod olduğu belirlenmiştir.

2.2.2. *Trichosporon asahii* ve Biyofilm

Trichosporon asahii'nin, tek, küresel, oval ya da elipsoidal şekilli hücrelerden oluşan maya formu, tübüler filamentlerden oluşan hif formu ve hiflerin bölünmesi sonucu oluşan aseksüel sporlar olan ve zincir oluşturan artrokonidi formu olmak üzere üç farklı morfolojik formu bulunabilmektedir [1]. *T. asahii* biyofilminde de maya, hif ve artrokonidi formları bir arada bulunmaktadır. İlk olarak maya hücresi yüzeye adhere olmakta ve filamentasyon ile biyofilm olgunlaşmaktadır. Fakat *T. asahii*'nin biyofilm oluşturma mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamıştır [1].

Montoya ve ark. [2] *T. asahii* genotiplendirme çalışması yapmış ve genotip -biyofilm oluşturma arasında ilişkiyi araştırmışlardır. Fakat genotipler, klinik örnekler ve biyofilm oluşturma arasında anlamlı bir ilişki saptayamamışlardır. Çalışılan tüm klinik örneklerde biyofilm varlığı gösterilmiştir.

2.2.3. Biyofilm Oluşumu Sırasında Sentezlenen Enzimler

Biyofilm oluşumunun ilk basamağı adezyondur ve adezyon sırasında mikroorganizmalar birçok enzim sentezlemektedir.

Candida albicans hif formunda HWP1, ALS3 ve ECE1 gibi hife özgü adezyon faktörleri üretir ve bu sayede hif formu maya formundan daha yapışkan hale gelmektedir [35]. Bu nedenle *C. albicans*'ın biyofilm oluşumunda hif formu önemlidir. Grald ve ark. [36]'nın çalışmasında, hif formu baskılandığında, biyofilmin indirgendiği belirlenmiştir. Kurakado ve ark. [1]'nin çalışmasında ise *T. asahii* biyofilminde hem hif formunun ve hem de artrokonidi formunun adezyon için önemli olduğu belirtilmiş olup, artrokonidyanın biyofilm oluşumunda anahtar rol oynadığı belirlenmiştir.

Mantarlar çevresel strese maruz kaldığında morfolojik değişimler göstermektedir ve bu değişimler mantarın konakta hayatta kalma şansını arttırmaktadır [1]. Örneğin nitrojen açlığı, *C. albicans*'ta amonyum geçirgenliğini sağlayan Mep2'yi indüklerken, Tor-kinaz aktivitesini indirgemekte, bunun sonucunda da hif formu oluşumu artmaktadır [37, 38, 39]. Wang ve ark. [40]'nın yapmış olduğu çalışmada, *Trichosporon cutaneum*'un Mep2 ve Rhb1 ortologlarının ekspresyon değişikliklerinde *C. albicans*'a benzer yolları kullandığı belirlenmiş olup, bu Tor ile ilişkili yolağın *T. asahii*'de de morfolojik değişimlere sebep olabileceği düşünülmektedir [1].

2.2.3.1. GAPDH Enzimi

Moleküler ağırlık olarak Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enzimi (GAPDH), 35-40 kDa büyüklüğünde bir enzimdir [3]. GAPDH, gliseraldehit-3-fosfatın d-gliserat 1-3-bisfosfata fosforilasyonunu kataliz ederek glikolizin basamağından sorumlu olan sitoplazmik ve glikolitik bir enzim olarak bilinmekteydi. Son yıllarda yapılan çalışmalarla enzimin çok işlevli olduğu gösterilmiş ve hücrede, sitoplazma, çekirdek, mitokondri ve küçük veziküler fraksiyonlarda lokalize olduğu bildirilmiştir. GAPDH, mantar ve bakterilerde, hücre yüzeyinde de yerleşim göstererek, hücre duvarının dış yüzeyinde yapışma molekülü olarak görev yapmakta ve dış yüzeydeki miktarlarını değiştirebilmektedir [3]. *Penicilium marneffe*, *C. albicans*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* gibi patojenlerin hücre yüzeyinde bulunduğu bildirilmiştir [3, 41, 42].

Örneğin; *C. albicans*'ın dış yüzeyindeki GAPDH, fibronektin ve laminine bağlanmaktadır [3, 41, 43]. Lau ve ark. [41]'nin bir dimorfik mantar olan *Penicilium marneffe* ile yapmış oldukları çalışmada GAPDH ve ısı şoku proteini 60 (HSP 60)'ın adezyondaki rolü araştırılmış olup, GAPDH'nin insan hücre dışı matris proteinlerine ve pnömositlere bağlanarak adezyon faktörü olarak rol aldığı, HSP 60'ın ise değişim göstermediği tespit edilmiştir. Waingeh ve ark. [44]'nin yapmış olduğu çalışmada da maya GAPDH'nin maya F-aktinine bağlandığı tespit edilmiştir.

Ichikawa ve ark. [3]'nin yapmış olduğu çalışmada adhere olan *T. asahii* kökenlerinde artrokonidya oluştuğu ve yüzeylerinde GAPDH bulunduğu bildirilmiştir. GAPDH'nin *T. asahii* yapışmasındaki fonksiyonel rolünü aydınlatmak için daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir.

2.3. TRICHOSPORON ASAHII VE ANTİFUNGAL İLAÇLAR

Flusitozin nükleik asit sentezini inhibe ederek, fungistatik etki gösteren antifungallerden biridir ve bir primidin analogudur. *T. asahii* flusitozine doğal dirençli olduğu için trikosporonoz tedavisinde yeri yoktur [45].

Ekinokandinler ise gluklan sentez inhibitörüdür ve 1,3-beta gluklan sentetaz enzimini inhibe ederek, mantar hücre duvarındaki 1,3-beta-D-gluklan sentezini önlemektedir. *T. asahii* enfeksiyonunda ise klinik aktivitesi minimum düzeydedir ve ekinokandin tedavisi altındayken

bile hasta trikosporoz geçirebilmektedir. Bu nedenle klinik olarak bu antifungalın tedavide kullanımı tavsiye edilmemektedir [13, 46].

Amfoterisin B, fungisidal etkili poliyen grubu bir antifungaldir. Mantarın hücre zarında bulunan ergosterole bağlanır ve hücre zarında porlar oluşturarak, dolayısıyla hücre zarı yapısını bozarak etkisini göstermektedir. *T. asahii* tedavisinde AMB, uzun yıllardır kullanılmaktaydı, son yıllarda ise AMB'ye duyarlılığın azaldığı ve klinik olarak etkinlik göstermediği bildirilmiş olup monoterapi olarak iyi bir seçenek olmadığı bildirilmiştir [47, 48, 49, 50]. Lipozomal AMB'nin de *Trichosporon* cinsinde klinik olarak etkinliğinin zayıf olduğu bildirilmektedir, fakat duyarlılık testleri yapılarak klinik olarak uygulanabileceği doğrulandığında tedavide kullanımı düşünülebilmektedir [51].

Azoller, ergosterol sentezini sitokrom P-450 bağımlı lanosterol 14 alfa demetilaz enzimini inhibe ederek hücre membranında bulunan ergosterol sentezini engelleyen antibiyotiklerdir. Azoller imidazol ve triazoller olarak iki gruptan oluşmaktadır. Triazoller, imidazollere göre hedef enzime daha spesifik bağlanmaktadır. Flukonazol (FLC), itrakonazol, vorikonazol (VOR), posakonazol (POS), ravukonazol, albakonazol ve isavukonazol triazol günümüzde mantar enfeksiyonlarında tercih edilen azol grubu antifungallerdir [47, 48]. Azoller ve özellikle yeni triazollerin hem monoterapi hem de kombinasyon tedavisinde iyi bir terapötik strateji olduğu bildirilmiştir. Özellikle FLC, POS, VOR ve ravukonazolün etkili olduğu açıklanmıştır [49].

Yapılan klinik çalışmalarda ve hayvan deneylerinde *in vivo* koşullarda VOR'un etkin bir ilaç olduğu gösterilmiştir. POS'un etkisini araştıran fare modeli çalışmaları ümit vericidir fakat klinik çalışmalar henüz sınırlıdır [45, 46, 48].

Günümüzde *Trichosporon* türlerinin invaziv enfeksiyonlarında birinci basamak tedavide, oral/parenteral azoller uygulanmaktadır. Özellikle POS veya VOR birinci basamak tedaviler olarak kabul edilirken, FLC alternatif ilk seçenek olarak kabul edilebilmektedir. Fakat FLC için yapılan çalışmalarda yüksek MİK değerleri mortalite oranıyla ilişkilendirilmektedir. AMB ise ikinci basamak tedavi olarak düşünülmektedir [49, 52, 53]. Birçok *in vitro* çalışmada AMB ve FLC için yüksek MİK değerleri rapor edilmiştir. Özellikle *in vitro* çalışmalarda, *T. asahii*'de, VOR, POS, ravukonazol ve izavukonazol gibi yeni azollerin, FLC ve AMB'den daha etkili antifungaller olduğu gösterilmiş olup, ekinokandinler, flusitozin ve AMB'nin tek başına kullanımının klinik etkinliğinin olmadığı belirlenmiştir ve tedavide kullanılmamaktadır [4, 10,

46, 48, 54]. Özellikle VOR'ün *in vitro* çalışmalarda en etkili antifungal olduğu gösterilmiş olup, ESCMID/ECMM klavuzlarında birinci basamak tedavide önerilmektedir [45, 49, 51, 55]. Ayrıca 5- Flusitozin ve AMB kombinasyonunun *T. asahii* enfeksiyonu tedavilerinde klinik etkinliğinin olduğunu gösteren literatürler de mevcuttur [49, 52].

Yapılan çalışmalarda biyofilm oluşturan *T. asahii* türlerinin planktonik hücrelere göre AMB, FLC ve VOR duyarlılığının azaldığı bildirilmiştir [2, 28]. Di Bonaventura ve ark. [28]'nın çalışmasında *T. asahii* biyofilmlerinin planktonik hücrelere karşı en aktif ilaç olan VOR'e 16.000 kat daha az duyarlı olduğu belirlenmiş olup, Montoya ve ark. [2]'nin çalışmasında ise, biyofilm oluşumunun AMB duyarlılığını dört kat, FLC duyarlılığının ise 256 kat azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca daha güçlü biyofilm oluşturan türlerin antifungal duyarlılığının daha fazla azaldığı da bildirilmiştir [2].

3. YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN KÖKENLER VE GEREÇLER

3.1.1. Hasta Kökenleri ve Referans Kökenler

Deneysel olarak kurgulanan bu çalışmaya; İstanbul Üniversitesi–Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı’nda 2014-2019 yılları arasında apse, el-ayak tırnağı, deri kazıntısı, dren sıvısı, idrar ve kan örneklerinden hastadan alındığı yıllarda izole edilip MALDI-TOF MS yöntemiyle tanımlanmış olan 30 adet *T. asahii* kökeni dahil edildi. Kökenlerin 9’u ayak tırnağı, 8’i idrar, 4’ü el tırnağı, 4’ü deri kazıntısı, 3’ü kan, 1’i dren sıvısı ve 1’i apsedan izole edilmiştir. Bir hastaya ait bir köken seçilerek çalışıldı.

Kullanılan referans kökenler;

- *Trichosporon asahii* var. *asahii* CBS 2479 (Biyofilm, protein tayini ve antibiyogramda kullanıldı) (National Collection of Pathogenic Fungi, 3851)
- *Candida krusei* ATCC 6258 (Antibiyogramda kullanıldı) (American Type Culture Collection)
- *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (Antibiyogramda kullanıldı) (American Type Culture Collection)

Biyofilm oluşumu optimizasyon çalışması için ise, yukarıda bahsi geçen 30 hasta kökeni içerisinden rastgele seçilmiş olan 2017 ve 2019 yıllarına ait idrardan izole edilmiş 2 adet *T. asahii* kökeni ve *T. asahii* var. *asahii* CBS 2479 referans kökeni kullanıldı.

3.1.2. Besiyerleri

- Saboroud %4 Dekstroz Agar (SDA) (Merck)
- Saboroud %2 Dekstroz Broth (SDB) (Merck)
- RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Buyyon (L-glutamin ve fenol kırmızı içeren, sodyum bikarbonat içermeyen) (Wisent Multicell)

3.1.3. Kimyasal Maddeler, Antifungal İlaçlar ve Antikor

- Gliserol (Wisent Multicell)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Biomatik)
- Kristal viyole çözeltisi (%0,4) (Tekkim)
- Etanol (%95) (Sigma)
- 3-(N-morfolino) propan sülfonik asit (MOPS) (Wisent Multicell)
- Fosfat tamponlu salin (PBS) (Wisent Multicell)
- 2,3-Bis-(2-Metoksi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT)(Biomatik)
- Menadion (Sigma)
- Amfoterisin B (Biomatik)
- Posakonazol (Sigma)
- Flukonazol (Sigma)
- Sığır Serum Albumin (BSA) (Biomatik)
- TWEEN 20 (Biomatik)
- Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) proteini poliklonal antikor (Tavşan kökenli) (Cell Signaling Technology)
- Bayır turpu peroksidazı (HRP) işaretli sekonder antikor (Tavşan kökenli) (Thermo Fisher Scientific)
- Protein Standardı (Biorad)
- Bradford reaktifi (Biorad)
- Laemmli buffer (Biorad)
- β -merkaptoetanol (Biorad)
- Tris baz (Merck)
- Glisin (Merck)
- Sodyum dedosil sülfat (SDS) (Merck)

3.1.4. Filtreler ve Sarf Malzemeler

- 0.22 μ m'lik selüloz asetat membran filtre (Aisimo)
- U tabanlı, 96 kuyucuklu steril ve kapaklı polistren mikroplaklar (Nest)
- Düz tabanlı, 96 kuyucuklu steril ve kapaklı polistren mikroplaklar (Nest)

- Düz tabanlı, 6 kuyucuklu steril ve kapaklı polistren mikropalaklar (Nest)
- 3ml'lik Steril Pastör Pipeti (Nest)
- Steril, plastik petri kabı (Nest)
- Steril, tek kullanımlık öze (10µm) (Biosigma)
- Eppendorf tüp (0,6 ve 2 ml) (DNAz ve RNAz içermeyen) (Nest)
- Falcon tüp (15 ve 50 ml) (DNAz ve RNAz içermeyen) (Nest)
- Mikropipet ucu (10 µl, 200 µl ve 1000 µl 'lik) (DNAz ve RNAz içermeyen) (Nest)
- Thoma lamı (Marienfeld)

3.1.5. Kullanılan Ticari Kitler

- Mantar için protein izolasyon kiti (Zymoresearch)
- Nitroselüloz Transfer Kiti (Biorad)
- Hazır poliakrilamid jel (Biorad)
- ECL kemilüminesans substrat kiti (Abbkine)

3.1.6. Araçlar ve Aygıtlar

- Otoklav (Hirayama)
- Etüv (Sanyo)
- Derin dondurucu (-20°C) (Beko)
- Derin dondurucu (-80°C) (Bosch)
- Buzdolabı (+4°C) (Beko)
- Su Banyosu (Electromag)
- Cam malzemeler (Erlab)
- Pasteur fırını (Electromag)
- pH metre (Inolab)
- Spektrofotometre (Biotek)
- Vorteks karıştırıcı (Biosan)
- Santrifüj (Hettich)
- Hassas terazi (Scaltec)
- Terazi (Scaltec)
- Isı Bloğu (Biotechne)
- Otomatik pipetler (10-20-200-1000 µl) (Thermo Scientific)
- Biyogüvenlik kabini (Heraus)

- Manyetik karıştırıcı (Biosan)
- Çalkalayıcı (DLAB)
- Distile su cihazı (GFL)
- Elektroforez (Biorad)
- Western blot cihazı (Biorad)
- Görüntüleme cihazı (ECL cihazı) (ER-Biyotek)
- Mikroskop (Zeiss)

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN KÖKENLERİN ÜRETİLMESİ

Çalışmada kullanılan hasta kökenleri ve referans kökenlerinin hepsi -80°C'deki stoklardan alınarak çözülmesi beklenmeden, steril öze ile kazıma yöntemiyle alınarak, SDA'ya ekildi ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Daha sonra tekrar kullanabilmek için %15 gliserollü SDB'de -80°C'de stoklandı. Elde edilen 48 saatlik SDA kültürleri çalışmanın diğer aşamalarında kullanıldı.

3.3. BİYOFİLM OLUŞUMU

3.3.1. Biyofilm Oluşumunun Optimizasyonu

Çalışmada kullanılacak 30 kökenden rastgele seçilen iki adet hasta kökeni (2017 ve 2019 kökeni) ve referans köken olmak üzere toplam üç köken, optimizasyon için kullanıldı. Kökenlerde biyofilm oluşumunun optimizasyonu için Iturrieta-González ve ark. [9]'nın çalışmasına benzer şekilde farklı parametreler uygulandı. Uygulanan parametreler; 10^5 , 10^6 ve 10^7 hücre/mL konsantrasyonda inokulum miktarları; 60, 90 ve 120 dakika boyunca adezyon süreleri; 48 ve 72 saatlik biyofilm olgunlaşma süreleri; statik ve 100 rpm çalkalamalı ortamlardı. Bu parametrelerin kombinasyonları ile her bir köken için 36 farklı deney süreci uygulandı ve her deney 2 kez tekrar edildi.

3.3.2. Kökenlerde Optimize Biyofilm Oluşumunun Sağlanması

RPMI 1640 besiyeri CLSI M27A3 rehberine göre MOPS ile hazırlandı (pH: 7.0) ve filtreden geçirilerek steril edildi. Hazırlanan besiyeri +4°C'de muhafaza edildi. SDA'da üretilmiş 48 saatlik mantar kültürlerinden steril öze ile birkaç koloni alındı ve koloniler 15 mL'lik falkon tüplerdeki RPMI 1640 besiyerine ekilerek, 37°C'de, gece boyunca inkübe edildi.

Ertesi gün hücreler 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Pellet iki kere 1 mL PBS ile yıkandı. RPMI besiyeri ile 10^7 hücre/mL (530 nm dalga boyunda 0,4 O.D.) konsantrasyonda hücre süspansiyonu hazırlandı. Düz tabanlı, 96 kuyucuklu polistren mikroyağın her kuyucuğuna 100 μ L hazırlanan hücre süspansiyonundan eklendi. Her bir izolat için 3 kuyucuğa ekim yapıldı. 37°C'de, 120 dk inkübe edildikten sonra, üst sıvı atılarak her kuyucuk 150 μ L PBS ile yıkandı. Bu yıkama işlemi ile yüzeye yapışmayan hücreler uzaklaştırılmış oldu. Son aşamada her kuyucuğa 150 μ L RPMI besiyeri eklenerek, 37°C'de, 72 saat inkübe edildi ve böylelikle biyofilm oluşumuna izin verildi. Her 24 saatte bir üst sıvı atılarak yeni 150 μ L RPMI besiyeri ile değiştirildi ve her deney 3 kez tekrar edildi.

3.3.3. Kökenlerde Biyofilm Oluşumunun Kristal Viyole Yöntemi ile Tayini

Biyofilm oluşumu sonrasında üst sıvı aspire edildi ve iki kere 200 μ L PBS ile yıkandıktan sonra 45 dk oda sıcaklığında kurutuldu. Her kuyucuk, 110 μ L %0,4'lük kristal viyole ile 45 dk boyandıktan sonra boya dökülerek 300 μ L steril distile su ile 5 kere yıkandı. Hücre içine alınmış olan boyanın açığa çıkartılması için 200 μ L %95'lik etanol ile 45 dk inkübe edildi ve 100 μ L'si yeni steril düz tabanlı, 96 kuyucuklu polistren mikroyağa aktararak spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda her köken için absorbans değerleri ölçüldü.

3.4. GAPDH MİKTARI TAYİNİ

Biyofilm oluşumunda kullanılan 96 kuyucuklu, düz tabanlı mikroyağdaki hücre miktarı protein izolasyonu için yetersiz olduğundan dolayı 6 kuyucuklu, düz tabanlı mikroyağlarda biyofilm oluşumu gerçekleştirildi. Yukarıdaki biyofilm oluşumu aşamaları, 6 kuyucuklu, düz tabanlı mikroyağdaki hücre miktarına göre oranlanarak uygulandı. En son aşamada, 72 saatlik biyofilm oluşumundan sonra tüm hücreler 1 mL PBS ile yıkandıktan sonra biyofilmlerin üzerine 2 mL RPMI 1640 besiyeri eklenerek steril kazıyıcı çubuklar ile kuyucuk tabanından kazındı ve mikropipet ile toplanarak 15 mL'lik falkon tüplere alındı. Santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı ve pellet protein izolasyonu için kullanıldı.

3.4.1. Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu için, mantarlara uygun ticari kit kullanıldı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda izolasyona başlamadan önce liyofilize olarak gönderilen zimoliyaz enzimi 200 μ L saklama tamponu ile vorteksenerek çözülmesi sağlandı. Tüm protein izolasyon

süreci buz üzerinde gerçekleştirildi. Protein izolasyonu için toplanan biyofilm pelleti üzerine 25 µLY-lizis tamponu ve hazırlanan zimoliyazdan 1 µL eklendikten sonra 37°C’de 60 dk inkübe edildi.

3.4.2. Protein Miktarının Bradford Yöntemi ile Belirlenmesi

İncelenen tüm kökenlerden elde edilen proteinler, kör ve standart proteinler için birer eppendorf tüp hazırlandı ve her tüpe 1 mL Bradford reaktifi (1x) eklendi. Standart proteinler için BSA kullanıldı ve sırasıyla; 2-4-10-20-40 µg/mL konsantrasyonda 5 adet standart protein distile su ile dilüye edilerek hazırlandı. Diğer tüm kökenler için önceden eklenmiş olan 1mL Bradford reaktifleri üzerine 10 µL izole edilen proteinlerden eklendi. 96 kuyucuklu, düz tabanlı mikropiplara her örnekten 3 kuyucuk tekrarı olacak şekilde 200 µL protein-bradford reaktifi karışımı eklendi. Elektroforezde 590 nm dalga boyunda ölçüldü. Standart proteinlere göre hücrelerin protein miktarları hesaplandı. Son olarak western blot için yapılacak olan jel elektroforezinde kuyucuklara eşit miktarda total protein eklemek için Laemmli tamponu ve β-merkaptoetanol karışımından (9:1) oluşan yükleme tamponu ile gerekli oranlarda eklenerek konsantrasyonlar eşitlendi.

3.4.3. Proteinlerin Denatüre Edilmesi

Yükleme tamponu ile hazırlanan eşit konsantrasyondaki total proteinler denatürasyon için kuru ısı bloğunda, 100°C’de derecede, 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası direkt olarak buz içerisine konuldu.

3.4.4. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Maya proteinlerini jel elektroforezinde yürütmek için kullanılacak yürütme tamponu 250 mM Tris baz, 1,92 M Glisin ve %1 SDS ile distile suyla hazırlandı. Hazırlanan stok yürütme tamponu, 1:10 oranında dilüye edilerek kullanıldı. Proteinleri yüklemek için hazır poliakrilamid jel kullanıldı ve jel, elektroforez tankına, dikey olarak yerleştirilerek, tank, maksimum hizaya kadar, yürütme tamponu ile dolduruldu. Jel üzerinde kuyucuk oluşması için daha önce firma tarafından konulmuş olan tarak çıkartılarak kuyucuklar açıldı (Kuyucuk kapasitesi 15 µL’dir ve her jel 15 kuyucuktan oluşmaktadır.). İlk kuyuya protein standardı eklendi ve sırasıyla diğer tüm proteinler eklendi (Protein standardı sırasıyla, 10-15-20-25-37-50-75-100-150-250 kDa moleküler ağırlığına sahip proteinlerden oluşmaktadır. Bizim aradığımız GAPDH enzimi 30-40 kDa büyüklüğünde olduğu için, bu protein standardında 37

kDa hizalarına denk gelmesi gerekmektedir). Jel elektroforez tankının kapağı kapatılarak voltaj kabloları uygun şekilde bağlandıktan sonra elektroforez cihazı, 120 voltta 45 dk'ya ayarlandı. Elektroforez sonrası jel kaseti çıkarılarak açıldı ve jel alınarak distile suya kondu.

3.4.5. Western Blot Yöntemi

Jelden, nitroselüloz membrana aktarım Semi-dry tekniği ile firmanın talimatlarına uygun olarak yapıldı. Transfer tamponu, transfere başlamadan önce etanol ve distile su ile talimata göre hazırlandı. Proteinlerin yürütülmüş olduğu jel distile sudan, transfer tamponu ile doldurulmuş bir kaba aktarıldı. Western blot cihazının sünger kısmı transfer tamponu ile ıslatıldı ve üç adet filtre kâğıdı, transfer tamponu ile ıslatılarak cihazın zeminine üst üste konuldu. Nitroselüloz membran önce distile sudan geçirilip sonra transfer tamponu ile ıslatılarak filtrelerin üzerine konuldu. Transfer tamponu dolu kapta duran proteinlerin yürütüldüğü jel de membran üzerine konuldu. Tekrar üç adet filtre kâğıdı, transfer tamponu ile ıslatılıp jelin üzerine konuldu. Silindir bir çubukla, jel- membran- filtre kâğıdı sandviçinin üzerinden tek yönlü olarak geçilerek, arada kalmış olabilecek ve görüntüyü bozabilecek hava kabarcıkları alındı. Son olarak western blot cihazına yerleştirilerek, 200 voltta, 30 dk yürütüldü. Aktarımı kontrol etmek için distile sudan geçirildikten sonra, Panceu-S boyası eklenerek, moleküler ağırlığına göre ayrılmış protein bantlarının boyanması sağlandı ve aktarım yapıp yapılmadığı kontrol edildi. Daha sonra distile su ile yıkanarak Panceu-S boyası çıkartıldı. Aktarımdan sonra antikorun jel boşluklarına bağlanmaması için %5 BSA-PBS-T ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek jel bloklandı (T= Tween 20).

Primer antikor firmanın talimatına uygun olarak %5 BSA-PBS-T ile 1:5000 oranında dilüye edildi (GAPDH-Rabbit-Genetex poliklonal antikor). Membran bu primer antikor ile gece boyunca, +4°C'de, çalkalayıcıda inkübe edildi. Ertesi gün membran 5 kere PBS-T (%0,5) ile 5 dakika, çalkalayıcıda, oda sıcaklığında yıkandı.

Sekonder antikor %5 BSA-PBS-T ile 1:3000 oranında hazırlandı (HRP-Tavşan). Oda sıcaklığında, çalkalayıcıda, 1 saat inkübe edildi. %0,5 PBS-T ile 5 kez, 5 dakika, çalkalayıcıda ve oda sıcaklığında yıkandı.

Görüntüleme için ECL (enhanced chemiluminescence) kemilüminesans sistemi firmanın talimatlarına göre iki adet ECL solüsyonu 1:1 oranında hazırlanarak kullanıldı.

Hazırlanan ECL solusyonu membrana pipetle eklendi ve karanlıkta 3 dk bekletildi. Daha sonra ECL cihazında Genesys programında görüntüleme yapıldı.

3.5. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ

3.5.1. Antifungallerin Seri Sulandırımalarının Hazırlanması

Antifungal duyarlılık testleri, CLSI M27-A3 rehberine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle yapıldı. Çalışmamızda antifungal olarak, AMB, FLC ve POS kullanıldı. Bu antifungallerin konsantrasyon aralığı: AMB için, planktonik hücrelerde, 0,0313 ile 16 µg/mL; biyofilm formunda, 2-2048 µg/mL; FLC için, planktonik hücrelerde, 0,125 ile 64 µg/mL; biyofilm formunda, 2-2048 µg/mL; POS için, planktonik hücrelerde, 0,0313 ile 16 µg/mL; biyofilm formunda; 0,5-512 µg/mL arasında belirlendi. CLSI önerileri doğrultusunda, antifungal ilaçların çözülmesi için DMSO kullanıldı. Buna göre AMB ve FLC için, en yüksek konsantrasyon 2048 µg/mL olduğu için antifungalın liyofilize ana stoğu 100 katı olarak 204800 µg/mL konsantrasyonda, POS için 25600 µg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Konsantrasyonlara göre ne kadar miktarda antifungalı DMSO ile dilüye edeceğimizi hesaplamak için aşağıdaki formül uygulandı:

$$\text{Hacim (ml)} = [\text{Ağırlık (mg)} \times \text{Tahlil gücü (µg/mg)}] / \text{Konsantrasyon (µg/mL)}$$

Bu ilaçların steril cam tüplerde (12 x 75 mm), mikropakta elde edilecek son konsantrasyonlarının iki katı olacak şekilde ilaç seri sulandırımları hazırlandı.

3.5.2. Planktonik Hücrelerin Antifungal Profilinin Belirlenmesi

Tüm hasta kökenleri ve referans kökenler olan *Candida krusei* ATCC 6258 ve *Candida parapsilosis* ATCC 22019, SDA'da, 37°C'de, 48 saat üretildikten sonra, RPMI 1640 besiyeri ile $1-5 \times 10^6$ hücre/mL konsantrasyonda hücre süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyonlar RPMI 1640 besiyeri ile önce 1:50, daha sonra 1:20 oranında seyreltilerek $1-5 \times 10^3$ hücre/mL konsantrasyona getirildi. U tabanlı, 96 kuyucuklu, polistren mikropakların her köken için, stok olarak hazırlanmış antifungallerin çift kat seri sulandırımları, ilk ve son kuyucuk hariç her kuyucuğa farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde 100'er µL dağıtıldı. Son kuyucuk hariç diğer kuyucuklara hazırlanan maya süspansiyonundan 100'er µL eklendi. Son kuyucuk ise besiyeri kontrolü olarak kullanıldı ve 200 µL antifungal içermeyen RPMI 1640 besiyeri konuldu. Böylece antifungal konsantrasyonları 1:2 oranında seyreltilmiş oldu ve maya final

konsantrasyonu $0,5-2,5 \times 10^3$ hücre/mL oldu. Mikroplakların üzeri steril kapak ile kapatılarak 37°C 'de 48 saat inkübe edildi. Bir köken için bir antifungal testi en az 3 tekrarla yapıldı.

Amfoterisin B sonuçları gözle okundu ve üremenin en az %100 inhibe olduğu kuyucuk MİK değeri olarak değerlendirildi. FLC ve POS sonuçları ise gözle değerlendirildi. Ayrıca 630 nm dalga boyunda spektrometrik olarak ölçüldü. Azollerde MİK sonucu üremenin en az %50 inhibe olduğu kuyucuk seçilerek belirlendi.

3.5.3. Biyofilm Oluşumu Sonrası Hücrelerin Antifungal Profilinin Belirlenmesi

Tüm hasta kökenleri ve referans kökenler olan *Candida krusei* ATCC 6258 ve *Candida parapsilosis* ATCC 22019 SDA'da 37°C 'de, 48 saat üretilip, RPMI 1640 besiyeri ile yukarıda planktonik hücreler için anlatıldığı gibi $1-5 \times 10^3$ hücre/mL konsantrasyonda hücre süspansiyonundan 200 μL , U tabanlı, polistren, mikroplağa eklendikten sonra, biyofilm oluşumu gerçekleştirildi. Mikroplakların üzeri steril kapak ile kapatılarak 37°C 'de 120 dk inkübe edildi. Üst sıvı atılarak yüzeye tutunmayanlar uzaklaştırıldı ve tekrar 200'er μL RPMI 1640 besiyeri konularak 24 saat, 37°C 'de inkübe edildi. Biyofilm oluşum sürecinin 24. saatinde üst sıvı atılarak antifungallerin seri sulandırımından 200'er μL eklendi. 48. saat sonunda XTT redüksiyon testi ile değerlendirme yapıldı.

XTT 1 mg/mL konsantrasyonda PBS'te hazırlandı ve filtreden geçirildi. Menadion asetonunda 0,4 mM hazırlanarak filtreden geçirildi. Her deney için taze olarak 5:1 oranında XTT:Menadion hazırlandı. Her hücreye 188 μL PBS ve 12 μL XTT-menadione karışımı eklenerek, 2 saat 37°C 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 100 μL 'si başka mikroplağa aktararak spektrofotometrede, 490 nm dalga boyunda değerlendirildi. AMB, FLC ve POS için MİK sonucu üremenin en az %50 ve %80 inhibe olduğu kuyucuk seçilerek belirlendi. Bu sonuca biyofilm eradikasyon konsantrasyonu denildi ve en az %50'lik ve en az %80 inhibisyon olduğu belirlenen konsantrasyonlar MBEK50 ve MBEK80 ismi verilerek kısaltıldı. Bir köken için bir antifungal duyarlılık testi üç tekrarla yapıldı.

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatistiksel analiz Graphpad Prism 6.0 programı ile yapıldı.

Çalışmaya dahil edilen 30 hasta kökeni için biyofilm oluşturma kapasitesini gösteren, kristal viyole yöntemi ile belirlenmiş absorbans değerlerine göre rastgele üç kategoriye (düşük,

orta ve yüksek düzey biyofilm oluşturanlar) ayrıldıktan sonra bu biyofilm düzeylerinin arasındaki farkın anlamlı olduğunu istatistiksel olarak belirlemek için normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırılmasında kullanılan Mann-Witney U testi kullanıldı.

Biyofilm düzeyleri ve GAPDH düzeyleri arasındaki ilişki Pearson Korelasyon analizi ile değerlendirildi. Düşük, orta ve yüksek düzey biyofilm gruplarının GAPDH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı, ikiden fazla grup karşılaştırmalarında kullanılan Kruskal Wallis testi ile belirlendi.

Tüm hasta kökenlerinin planktonik ve biyofilm oluşturmuş hücrelerinin üç antifungale karşı belirlenmiş olan MİK, MBK50 ve MBK80'leri tek yönlü ANOVA testi olan Tukey testi ile karşılaştırıldı.

Tüm kökenlerin üç antifungale karşı planktonik ve biyofilm oluşturan hücreleri arasındaki MİK $\log_2$ ile biyofilm düzeyleri ve GAPDH düzeyleri arasındaki ilişki Pearson Korelasyon analizi ile değerlendirildi.

Klinik örneklerle göre, yüzeysel, diğer ve idrar kökenleri olarak ayrılan üç grubun; biyofilm düzeyleri (O.D.), GAPDH düzeyleri (alan) ve üç antifungalın (AMB, FLC ve POS) MİK değerleri, MBK80 değerleri ve bu ikisi arasındaki logaritmik artış ($\log_2$) değerlerine göre ayrı ayrı kıyaslanması için Tukey testi yapıldı.

Sonuçlar, %95 güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. OPTİMİZE BİYOFİLM OLUŞUMU YÖNTEMİNİN BELİRLENMESİ

Rastgele seçilmiş olan iki adet hastanın idrar örneğinden izole edilen köken ve referans köken için, inokulum miktarı 10^5 , 10^6 ve 10^7 hücre/mL; adezyon süresi 60, 90 ve 120 dk; biyofilm olgunlaşma süresi 48 ve 72 saat, statik ve 100 rpm çalkalamalı parametrelerinin kombinasyonları ile oluşturulan 36 farklı deney süreci uygulanarak, deney tekrarları ile standart sapma değerleri belirlendi ve elde edilen tüm grafikler karşılaştırılarak incelendi.

2017 yılında idrardan izole edilmiş köken için yapılan birinci ve ikinci deneylerden oluşturulan grafiklerden iki deney arasında en az fark olan parametreler Tablo 4.1’de gösterildi ve bu beş parametre; 10^5 hücre/mL, statik, 120 dk adezyon süresi ve 48 saat sonucu, 10^5 hücre/mL, çalkalamalı, 120 dk adezyon süresi ve 48 saat sonucu, 10^6 hücre/mL, çalkalamalı, 90 ve 120 dk adezyon süresi ve 48 saat sonucu ile 10^7 hücre/mL, statik, 120 dk adezyon süresi ve 72 saat sonucuydu.

2019 yılında idrardan izole edilmiş köken için yapılan iki deney sonucundan çıkarılan grafikler arasında en az fark olan parametreler Tablo 4.1’de gösterildi ve bu altı parametre; 10^7 hücre/mL, statik, 60 ve 120 dk adezyon süresi ve 48 saat sonucu, 10^6 hücre/mL, statik, 60 dk adezyon süresi ve 72 saat sonucu ile 10^7 hücre/mL, statik, 60, 90 ve 120 dk adezyon süresi ve 72 saat sonucuydu.

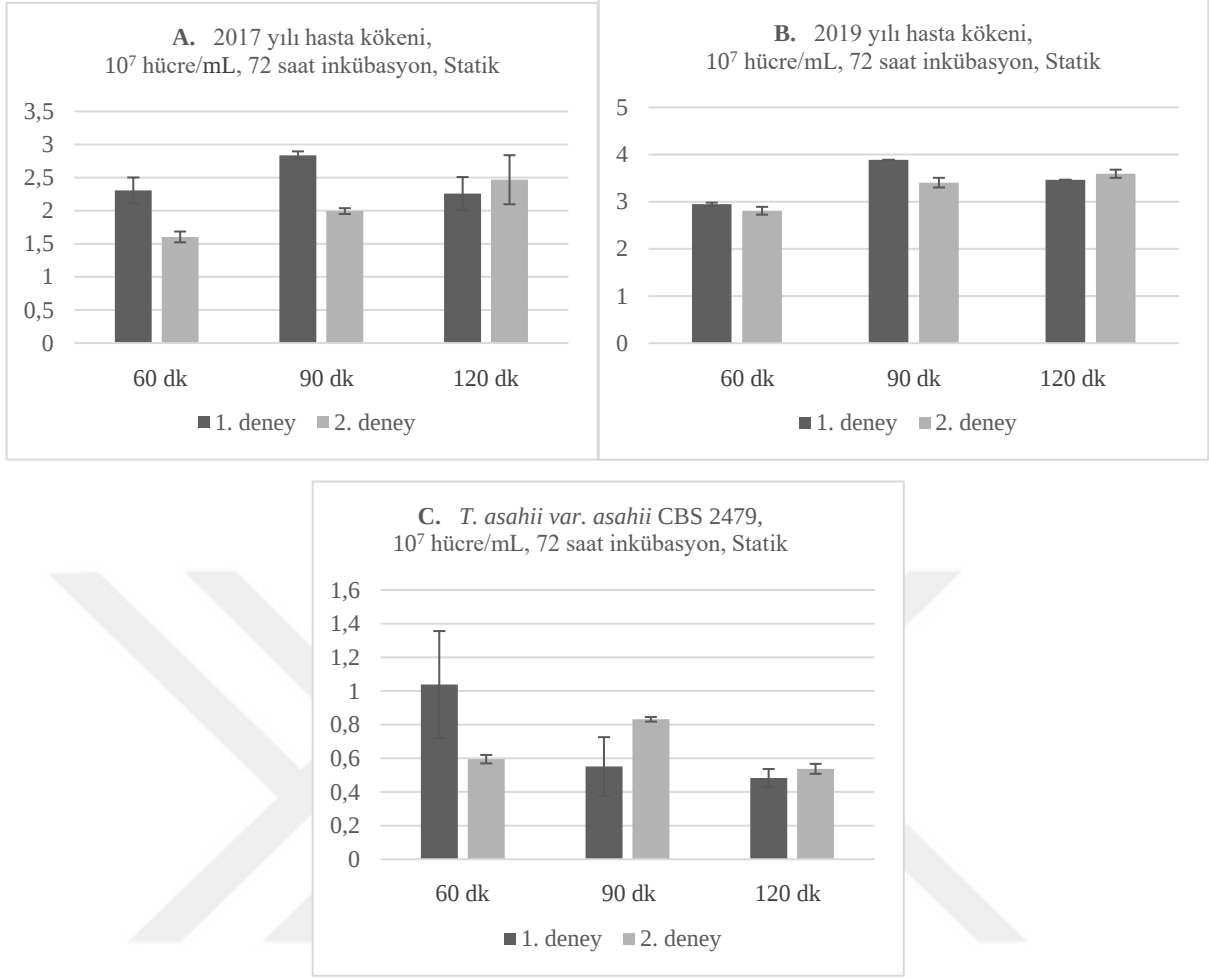
Referans köken olarak kullanılan *T. asahii* var. *asahii* CBS 2479 kökeni için de iki farklı deney yapılmış olup, oluşturulan grafiklerden iki deney arasında en az fark olan parametreler Tablo 4.1’de gösterildi ve bu iki parametre; 10^7 hücre/mL, çalkalamalı, 90 dk adezyon süresi ve 48 saat sonucu ile 10^7 hücre/mL, statik, 120 dk adezyon süresi ve 72 saat sonucuydu.

Tablo 4.1: Kullanılan 2 hasta kökeni ve referans kökeninde iki deney arasında en az fark olan parametreler.

Parametreler	Kökenler		
	2017	2019	CBS 2479
10^5 , 48 s, S, 120 dk	X		
10^7 , 48 s, S, 60 dk		X	
10^7 , 48 s, S, 120 dk		X	
10^5 , 48 s, Ç, 120 dk	X		
10^6 , 48 s, Ç, 90 dk	X		
10^6 , 48 s, Ç, 120 dk	X		
10^7 , 48 s, Ç, 90 dk			X
10^6 , 72 s, S, 60 dk		X	
10^7 , 72 s, S, 60 dk		X	
10^7 , 72 s, S, 90 dk		X	
10^7 , 72 s, S, 120 dk	X	X	X
Toplam	5	6	2

(10^5 , 10^6 , 10^7 : Kullanılan inokulum miktarları (hücre/mL), 48 s: 48 saat, 72 s: 72 saat, S: statik, Ç: çalkalamalı, 60 dk: 60 dakika adezyon süresi, 90 dk: 90 dakika adezyon süresi, 120 dk: 120 dakika adezyon süresi).

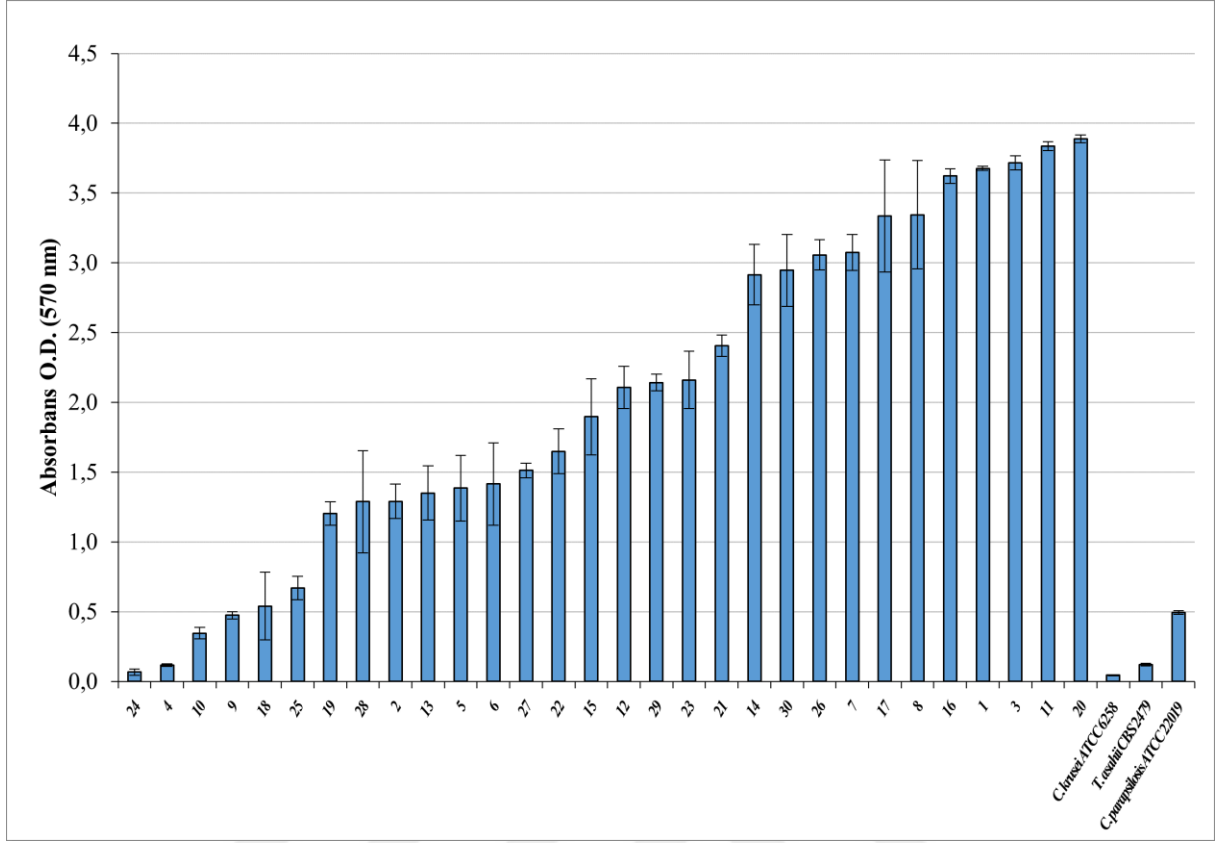
Dahil edilen 2 hasta kökeni ve referans kökenin 36 parametre içerisinde ortak deney tekrarı yapılabilen parametre optimize sonuç olup; 10^7 hücre/mL, statik, 120 dk adezyon süresi ve 72 saat sonucuydu. Üç kökenin grafikleri Şekil 4.1’de gösterildi.



Şekil 4.1: A. 2017 yılında izole edilen hasta kökeninin 10⁷ hücre/mL, 60, 90 ve 120 dk adezyon süresi, 72 saat inkübasyon ve statik koşullarda yapılan iki deneyin sonuçları, B. 2019 yılında izole edilen hasta kökeninin 10⁷ hücre/mL, 60, 90 ve 120 dk adezyon süresi, 72 saat inkübasyon ve statik koşullarda yapılan iki deneyin sonuçları, C. *T. asahii* var. *asahii* CBS 2479 referans kökeninin 10⁷ hücre/mL, 60, 90 ve 120 dk adezyon süresi, 72 saat inkübasyon ve statik koşullarda yapılan iki deneyin sonuçları.

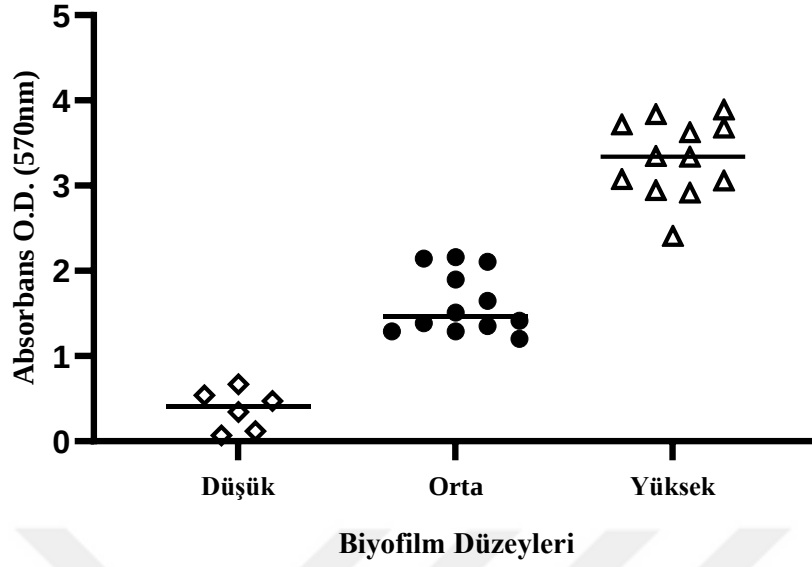
4.2. BİYOFİLM DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Çalışmaya dahil edilen 30 hasta kökeni ve 3 adet referans kökenin biyofilm düzeyleri 72 saatlik inkübasyon sonucunda kristal viyole yöntemi ile belirlendi. Hasta kökenlerinin absorbans değerleri 0,067 ile 3,889 arasında değişmekteydi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Otuz adet *T. asahii* hasta kökeni ve üç adet referans kökeninin biyofilm oluşumunun kristal viyole yöntemi ile belirlenen absorbans değerleri.

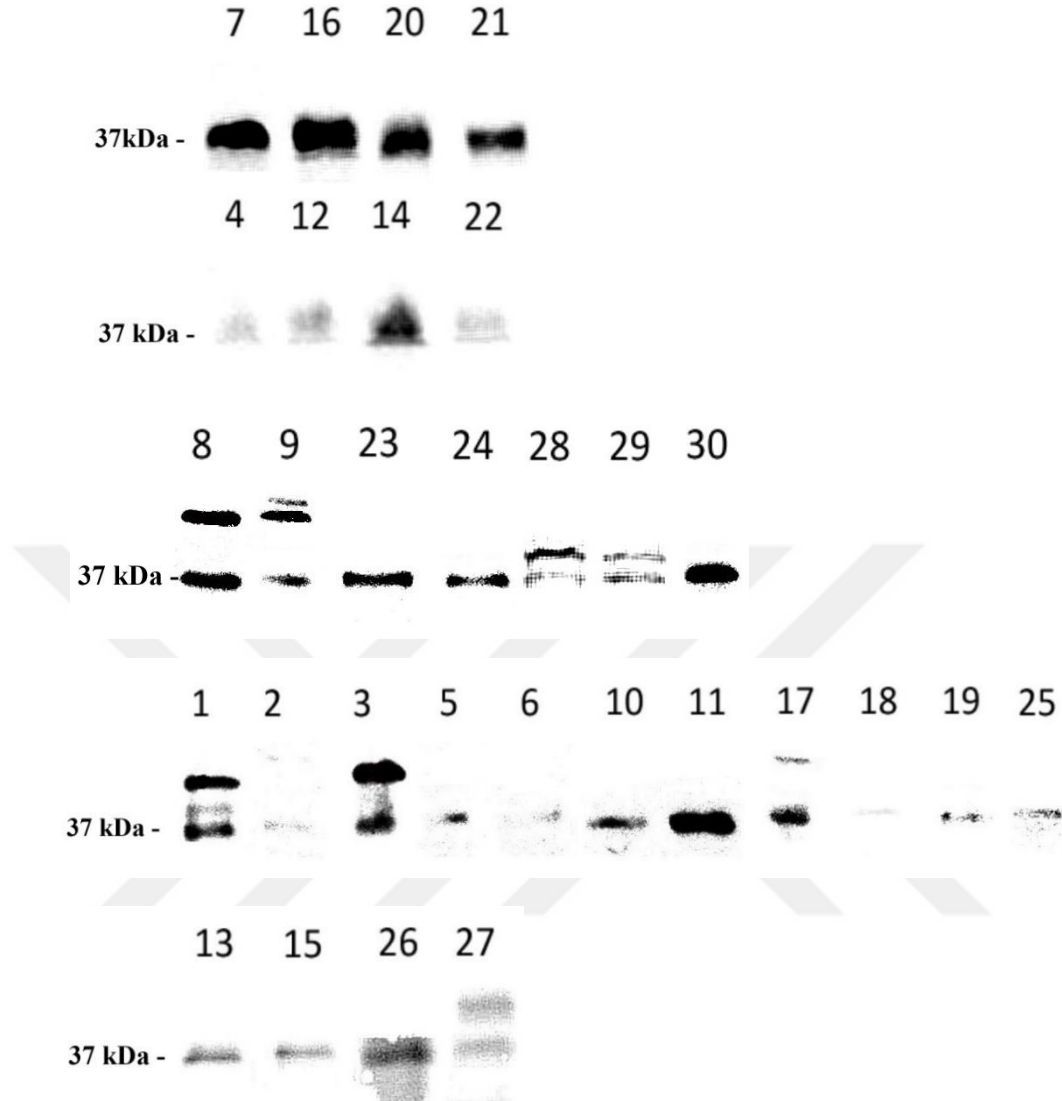
Biyofilm üretimi kapasitesini GAPDH üretim düzeyleri ve antifungal düzeyleri ile ilişkilendirmek için, 30 kökenin kristal viyole absorbans sonuçlarına bakılarak randomize olarak üç biyofilm oluşum kategorisine ayrıldı (Her grup istatistiksel analiz yapılabilmesi için $n \geq 6$ olacak şekilde ayrıldı). Bu kategoriler; $A_{570} < 1,0$ ise düşük düzey, $1,0 \leq A_{570} \leq 2,2$ ise orta düzey ve $2,2 < A_{570}$ ise yüksek düzey biyofilm oluşturanlardı. Daha sonra Mann-Witney U testiyle bu üç düzey birbirleriyle kıyaslanarak istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu: düşük düzey, orta düzeyle karşılaştırıldığında $p=0,0001$; orta düzey, yüksek düzeyle karşılaştırıldığında $p < 0,0001$; düşük düzey, yüksek düzeyle karşılaştırıldığında $p=0,0001$ 'di. Düşük düzey biyofilm medyan absorbans değeri, 0,4095 ($n=6$); orta düzey biyofilm medyan absorbans değeri, 1,463 ($n=12$) ve yüksek düzey biyofilm medyan absorbans değeri ise 3,340 ($n=12$) olarak bulundu (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Otuz adet *T. asahii* hasta kökeninin biyofilm oluşumunun kristal viyole yöntemi ile belirlenen absorbans değerlerine göre düşük (n=6), orta (n=12) ve yüksek (n=12) biyofilm düzeyi olarak kategorilere ayrılması.

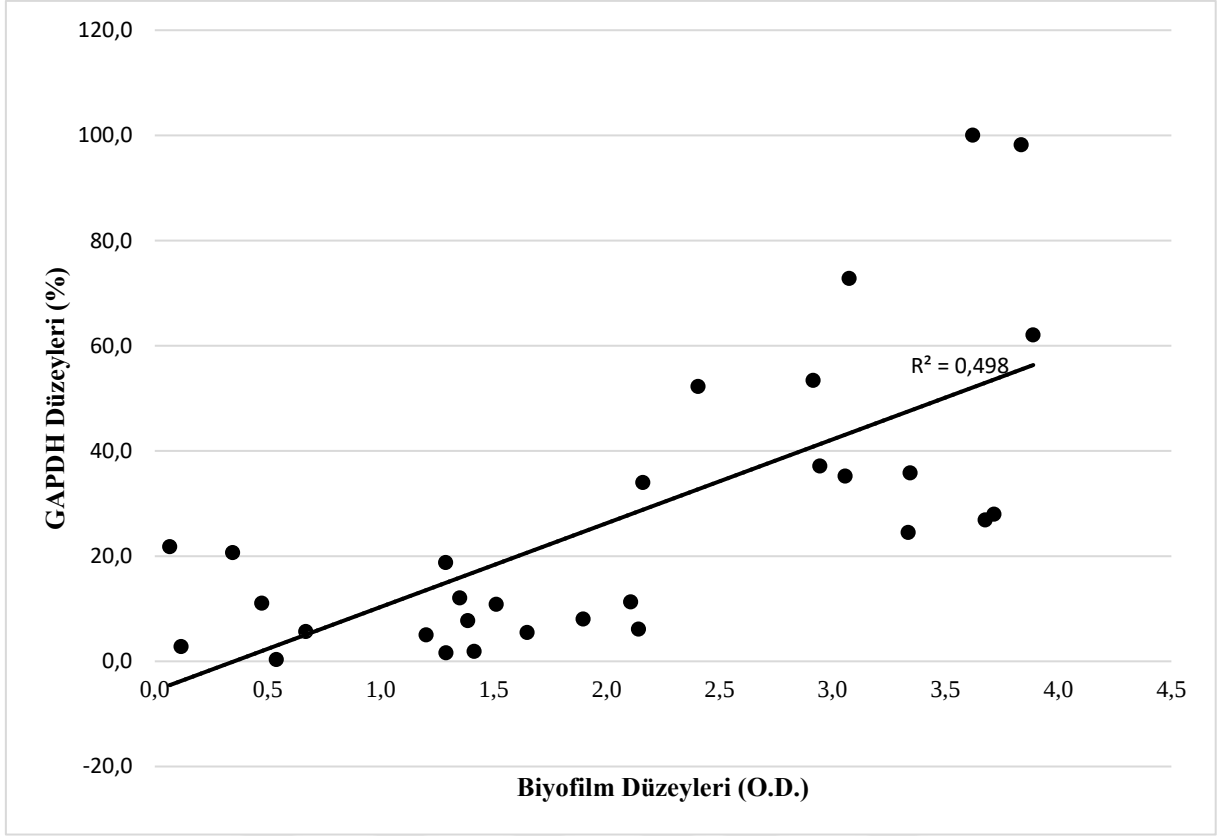
4.3. WESTERN BLOT SONUÇLARI

Çalışmaya dahil edilen 30 adet hasta kökeni ve *T. asahii* var. *asahii* CBS 2479 referans kökeni biyofilm oluşturduktan sonra protein izolasyonu ve SDS-PAGE jel elektroforez yöntemi ile total proteinlerinin molekül ağırlıklarına göre ayrılmasından sonra western blot yöntemi ile nitrocelüloz membrana aktarılarak GAPDH proteini primer ve sekonder antikorla işaretlendi ve kemilüminesans olarak görüntülendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Çalışmaya dahil edilen otuz adet hasta suşunun western blot yönteminde saptanan GAPDH protein bantları (37 kDa; kullanılan standart proteinde işaretli olan molekül ağırlığı).

Tüm hasta kökenlerinin GAPDH protein miktarları Image J programı kullanılarak, *T. asahii* var. *asahii* CBS 2479 kökeni her western blot uygulamasında referans olarak kullanılarak alan hesaplaması ile hesaplandı. En yüksek GAPDH miktarına sahip olan köken %100 alınarak, tüm GAPDH miktarları bu kökene göre yüzdelik olarak hesaplandı. Hesaplama sonrasında, hasta kökenleri biyofilm düzeyine göre sıralanarak, her kökenin biyofilm düzeyi absorbans değerleri ve GAPDH yüzdeleri arasında korelasyon testi yapıldı. Pearson korelasyonu $r = 0,7058$ (%71), $p < 0,0001$ saptandı. Sonuç olarak; pozitif eğilim olduğu ve kökenlerin biyofilm düzeylerinin arttıkça, GAPDH düzeylerinin de arttığı görüldü (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Otuz adet *T. asahii* hasta kökeninin biyofilm düzeylerinin absorbans değerleri ile GAPDH düzeylerinin yüzdesinin karşılaştırılması [Pearson korelasyonu $r=0,7058$ (%71), $p<0,0001$, $R^2=0,498$.].

Hasta kökenleri biyofilm düzeyine göre düşük, orta ve yüksek düzey biyofilm olmak üzere üç gruba ayrıldığında ise bu grupların GAPDH miktarları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu Kruskal Wallis testi ile gösterildi ($p<0,0001$).

4.4. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTİ SONUÇLARI

Çalışmada kullanılan 30 hasta kökeni, *C. krusei* ATCC 6258 ve *C. parapsilosis* ATCC 22019 referans kökenleri için antifungal duyarlılık testleri, CLSI M27-A3 rehberine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle yapıldı. Hem planktonik hücre olarak ve hem de biyofilm oluşumları sağlandıktan sonra hücrelerin AMB, FLC ve POS'a karşı MİK ve MBEK50 ve MBEK80'leri belirlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Tüm hasta kökenlerinin AMB, FLC ve POS'a karşı hem planktonik hücre olarak MİK değerleri ve hem de biyofilm oluşumları sağlandıktan sonra MBEK50 ve MBEK80 değerleri.

Klinik Örnek No.	Antifungaller								
	AMB			FLC			POS		
	MİK	MBEK50	MBEK80	MİK	MBEK50	MBEK80	MİK	MBEK50	MBEK80
24	2	2	2	1	64	128	0,5	8	512
4	1	2	2	0,125	4	128	0,5	512	512
10	2	2	8	0,125	64	1024	0,06	512	512
9	2	2	2	1	8	32	0,25	128	512
18	2	2	2	2	64	256	0,125	2	512
25	4	4	4	2	32	128	0,06	0,5	32
19	2	2	4	1	128	1024	0,06	32	512
28	2	2	2	0,125	2	1	0,06	0,5	0,5
2	2	4	8	0,125	4	512	0,5	0,5	512
13	1	2	4	1	32	512	0,03	0,5	1
5	1	2	2	0,25	2	16	0,03	0,5	512
6	1	2	4	1	256	512	0,03	512	512
27	2	2	2	0,5	16	128	0,125	0,5	0,5
22	2	2	2	2	32	256	0,03	0,5	512
15	1	2	2	0,5	8	256	0,06	0,5	128
12	2	4	4	0,25	16	512	0,25	2	512
29	2	2	2	0,125	2	4	0,06	0,5	0,5
23	0,25	2	2	0,125	512	1024	0,06	0,5	512
21	1	2	4	0,125	4	512	0,06	1	512
14	1	2	2	2	4	256	0,06	32	512
30	4	8	8	0,125	2	4	0,25	0,5	0,5
26	2	4	4	0,5	64	1024	0,03	512	512
7	0,25	2	2	0,125	256	1024	0,03	0,5	1
17	4	4	4	0,5	2	64	0,125	2	512
8	1	4	4	0,125	256	512	0,06	512	512
16	2	2	4	0,5	64	256	0,125	2	256
1	1	2	2	1	4	128	0,06	1	512
3	1	16	16	0,5	8	512	0,125	512	512
11	2	2	4	0,5	8	256	0,03	1	16
20	2	2	4	0,5	64	2048	0,06	512	512

Tüm hücrelerin MİK aralığı, MİK₅₀ (tüm kökenlerin en az %50'sinin MİK değeri), MİK₉₀ (tüm kökenlerin en az %90'ının MİK değeri), ve geometrik ortalamaları (GM) hesaplandı (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Tüm hasta kökenleri ve biyofilm düzeylerine göre ayrılmış grupların planktonik hücre ve biyofilm oluşturmış hücre olarak üç antifungale karşı *in vitro* aktivitelerinin MİK ve MBEK80 değerlerinin karşılaştırılması

Biyofilm Düzeyleri	Klinik Örnek Sayısı	Amfoterisin B							
		MİK				MBEK80			
		MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	GM	MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	GM
Tümü	30	0,25-4	2	2	1,48	2-16	4	8	3,25
Düşük	6	1-4	2	4	1,37	2-8	2	8	3,01
Orta	12	0,25-2	2	2	1,45	2-8	2	4	3,20
Yüksek	12	0,25-4	1	4	1,48	2-16	4	8	3,25

Biyofilm Düzeyleri	Klinik Örnek Sayısı	Flukonazol							
		MİK				MBEK80			
		MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	GM	MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	GM
Tümü	30	0,125-2	0,5	2	0,42	2-2048	256	1024	189,6
Düşük	6	0,125-2	1	2	0,48	32-1024	128	1024	290,4
Orta	12	0,125-2	0,25	1	0,42	2-1024	256	1024	220,7
Yüksek	12	0,125-2	0,5	1	0,42	4-2048	256	1024	189,6

Biyofilm Düzeyleri	Klinik Örnek Sayısı	Posakonazol							
		MİK				MBEK80			
		MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	GM	MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	GM
Tümü	30	0,03-0,5	0,06	0,25	0,08	0,5-512	512	512	101,6
Düşük	6	0,06-0,5	0,125	0,5	0,08	32-512	512	512	199,0
Orta	12	0,03-0,5	0,06	0,25	0,08	0,5-512	512	512	115,9
Yüksek	12	0,03-0,25	0,06	0,125	0,08	0,5-512	512	512	101,6

MİK: Minimal inhibisyon konsantrasyonu

MBEK80: Minimal biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (Üremenin en az %80'inin inhibe olduğu konsantrasyon)

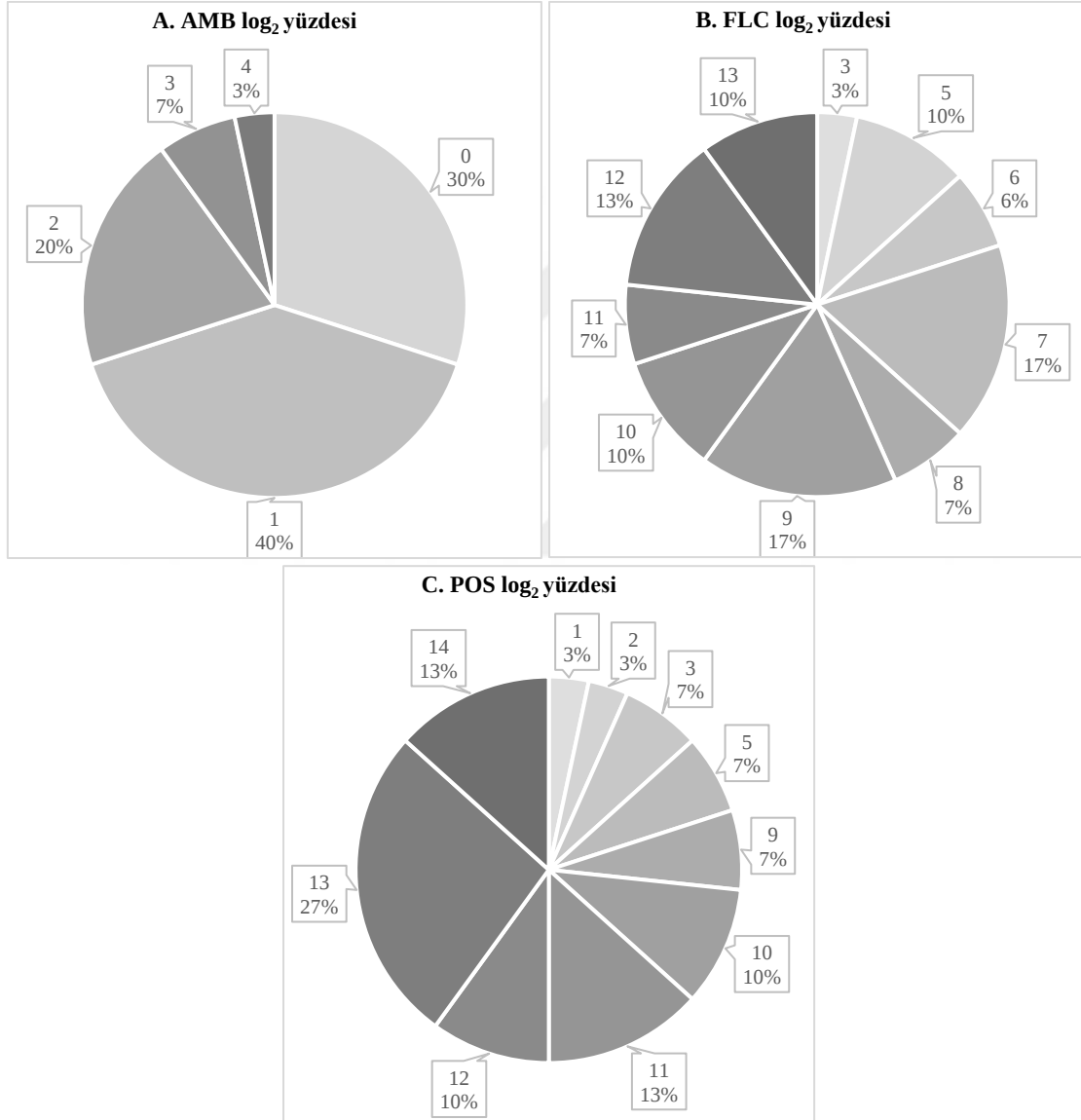
MİK₅₀: Tüm grubun en az %50'sinin üremesinin inhibe olduğu MİK/MBEK80 değeri

MİK₉₀: Tüm grubun en az %90'ının üremesinin inhibe olduğu MİK/MBEK80 değeri

GM: Geometrik ortalama

Tüm hasta kökenlerinin planktonik ve biyofilm oluşturmış hücrelerinin üç antifungale karşı belirlenmiş olan MİK, MBEK50 ve MBEK80'lerinin Tukey testi ile karşılaştırılması sonucu, amfoterisin B sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunamadı (AMB MİK ile MBEK50 karşılaştırıldığında $p>0,9999$ ve AMB MİK ile MBEK80 karşılaştırıldığında $p>0,9999$ bulundu). Flukonazol sonuçları karşılaştırıldığında, FLC MİK ile FLC MBEK50 anlamlı fark bulunamadı ($p=0,631$), FLC MİK ile FLC MBEK80 arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,0001$). Posakonazol sonuçları karşılaştırıldığında, POS MİK ile POS MBEK50 anlamlı fark bulunamadı ($p=0,601$), POS MİK ile POS MBEK80 arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,0001$).

Hasta kökenlerinde flukonazol ve posakonazolde biyofilm oluşturduğu zaman MİK değerlerinin (MBEK80), planktonik hücre MİK değerlerine göre logaritmik artış ($\log_2$) saptandı. Amfoterisin B'de ise otuz kökenin %30'unda $\log_2$ saptanmadı. Saptanan $\log_2$ aralıkları; AMB için 0-4 $\log_2$, FLC için 3-13 $\log_2$ ve POS için 1-14 $\log_2$ 'ydi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da gösterildi.



Şekil 4.6: Hasta kökenlerinde planktonik hücrelerdeki antifungal MİK değerleri ve biyofilm oluşturmuş hücrelerdeki MBEK80 değerleri arasındaki $\log_2$ 'ların yüzdelik oranları **A.** AMB için $\log_2$, **B.** FLC için $\log_2$, **C.** POS için $\log_2$.

Tüm kökenlerde, biyofilm oluşturma absorbans değerlerine ve GAPDH düzeylerine göre, planktonik hücre ve biyofilm oluşturan hücre arasındaki MİK değerlerindeki log₂ arasında anlamlı bir korelasyon bulunmamaktaydı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: Tüm kökenlerin üç antifungale karşı planktonik ve biyofilm oluşturan hücreler arasındaki MİK log₂ düzeyleri ile biyofilm düzeyleri ve GAPDH düzeylerinin Pearson Korelasyon analizi ile karşılaştırılması

	Biyofilm Düzeyleri (O.D.)			GAPDH Düzeyleri (Alan)		
MİK log ₂	Pearson r	R ²	P	Pearson r	R ²	P
AMB	0,3254	0,1059	0,08	0,2534	0,0642	0,18
FLU	0,2244	0,0504	0,23	0,2931	0,0859	0,12
POS	0,0694	0,0048	0,72	-0,0017	0,0000	0,99

Pearson korelasyon değeri: Pearson r
P: P değeri

4.5. KLİNİK ÖRNEKLERE GÖRE İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmaya dahil edilen 30 adet *T. asahii* kökeninin 9'u ayak tırnağı, 8'i idrar, 4'ü el tırnağı, 4'ü deri kazıntısı, 3'ü kan, 1'i dren sıvısı ve 1'i apseden izole edildi. Bu kökenlerden el tırnağı, ayak tırnağı ve deri kazıntısından izole edilenler yüzeysel kökenler olup, n=17'yd. İstatistiksel değerlendirme yapılabilmesi için n≥6 olması gerektiğinden; idrar, kan, apse ve dren sıvısından izole edilenler bir grup olarak değerlendirilip, diğer kökenler olarak adlandırıldı (n=13). Yüzeysel kökenler ve idrar kökenleri (n=8) de ayrıca iki farklı grup olarak değerlendirildi.

Klinik örnekler göre, yüzeysel, diğer ve idrar kökenleri olarak ayrılan üç grubun; biyofilm düzeyleri (O.D.), GAPDH düzeyleri (alan) ve üç antifungalın (AMB, FLC ve POS) MİK değerleri, MBEK80 değerleri ve bu ikisi arasındaki log₂ değerlerine göre ayrı ayrı Tukey testleriyle analizleri yapıldı. Sadece FLC MİK değerlerine göre yüzeysel ve diğer kökenler arasında ve yüzeysel ve idrar kökenleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu ve hem idrar kökenleri ve hem de diğer kökenler yüzeysel kökenlere göre daha yüksek FLC MİK değerlerine sahipti (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Numune türüne göre, yüzeyel, diğer ve idrar kökenleri olarak ayrılan üç grubun; biyofilm düzeyleri (O.D.), GAPDH düzeyleri (alan) ve üç antifungalın (AMB, FLC ve POS) MİK değerleri, MBEK80 değerleri ve bu ikisi arasındaki $\log_2$ değerlerine göre ayrı ayrı yapılan Tukey testleri sonucu elde edilen p değerlerinin gösterilmesi

Numune Grupları	Biyofilm Düzeyleri (O.D.)	GAPDH Düzeyleri (Alan)	AMB			FLC			POS		
			MİK	MBEK80	MİK $\log_2$	MİK	MBEK80	MİK $\log_2$	MİK	MBEK80	MİK $\log_2$
Yüzeyel - Diğer	0,91	0,91	0,84	0,20	0,82	0,02**	0,94	1,00	0,91	0,80	0,30
Yüzeyel - İdrar	0,67	1,00	0,99	0,34	0,86	0,02**	0,92	1,00	0,97	0,97	0,74
p Değerleri											

** : İstatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Trichosporon asahii; çevreden izole edilebildiği gibi, insan mikrobiyotasında da bulunmakta olup, yüzeyel ve mortalite oranı yüksek invaziv enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. *T. asahii* özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda invaziv araçlar üzerinde biyofilm oluşturabilmektedir [1, 2, 3, 5, 6, 9, 28].

Biyofilm oluşumu ile ilişkili faktörlerin tanımlanması biyofilm oluşturma mekanizmasının aydınlatılmasını sağlayabilir ve bu sayede invaziv trikosporonoz azaltılabilir [1].

Literatürlerde *T. asahii*'nin patogenezinde rol oynayan biyofilm oluşum mekanizmasının aydınlatılmasında, en sık kristal viyole yönteminin kullanıldığı görülmektedir ve bu yöntem ile çalışılırken öncelikle optimizasyon çalışmalarının yapıldığı tespit edilmiştir.

Bu amaçla dünyada yapılan çalışmalardan, Di Bonaventura ve ark. [28] yaptıkları çalışmada optimizasyon için hücrelerde; 10^4 , 10^5 ve 10^6 hücre/mL inokulum miktarını; 30, 60 ve 120 dakika adezyon süresini ve 24, 48 ve 72 saat biyofilm olgunlaşma süresini denemişlerdir. *T. asahii* hücrelerinin, 30 dakikalık inkübasyon sonunda polistiren yüzeylere yapışabildiğini tespit etmişlerdir. İlk 4 saatte içinde yapışan hücrelerin, erken mikrobiyal adaptif yanıtı temsil ettiğini ve mikrokoloni olarak organize olduğunu ve 6 saatten 72 saate kadar olgun biyofilm oluşumunun arttığını belirtmişlerdir. En optimal deney düzeneğini; 10^5 hücre/mL, 60 dk adezyon süresi ve 72 saat biyofilm oluşturma süresi olarak belirlemişlerdir. 72 saat inkübasyondan sonra ise, 25-40 μ m kalınlığında olgun biyofilm oluşturduğunu belirtmişlerdir. Oluşan olgun biyofilmi, hücre dışı matrise gömülü maya benzeri ve filamentli yapılar olarak tanımlamışlardır. Polistiren yüzeylerde mantarın kolonizasyonunda biyofilm oluşturma yeteneğinin anahtar rol oynadığını belirtmişlerdir.

Diğer bir optimizasyon çalışması olan Iturrieta-González ve ark. [9] çalışmasında ise; inokulum miktarı 10^5 , 10^6 ve 10^7 hücre/mL; adezyon süresi 60, 90 ve 120 dakika; biyofilm olgunlaşma süresi 48 ve 72 saat, 75 rpm çalkalamalı ve statik ortam parametreleri

denemişlerdir. En optimize sonucu 10^7 hücre/mL, 90 dk adezyon süresi, çalkalamalı ve 48 saat biyofilm süresi olarak belirlemiştir.

Montoya ve ark. [2]'nin yaptıkları çalışmada ise 10^7 hücre/mL inokulum miktarı sabit tutulmuştur. Burada adezyon süreleri karşılaştırılmış ve 1, 2, 4, 6 ve 8 saat olarak denenmiştir. Diğer çalışmaların aksine 1 ve 2 saat adezyonun yetersiz olduğunu tespit etmişlerdir fakat, 2 ve 4 saat arasında yüksek biyofilm üretimini gözlemlemiştir. Yüzey alanı yeterli olduğunda, maruz kalma süresinin artması yüksek virülanstan kaynaklandığını ve sonuç olarak da enfeksiyonun kalıcılığını arttırdığını tespit etmişlerdir.

İnceleyebildiğimiz kadarıyla Türkiye'de *T. asahii* biyofilm üretiminde optimizasyon çalışmasının yapıldığı herhangi bir araştırmaya rastlamadık.

Biz ise çalışmamızda, optimizasyon amacıyla, apse, el-ayak tırnağı, deri kazıntısı, dren sıvısı, idrar ve kan örneklerinden oluşan 30 hasta kökeni içinden rastgele seçtiğimiz ve idrardan izole edilmiş olan iki adet *T. asahii* kökeni ve referans kökenini kullanarak bu üç kökenin biyofilm oluşturma kabiliyetini kristal viyole yöntemini kullanarak inceledik. Bu amaçla bu iki köken ve referans kökene uyguladığımız 36 farklı deney sonucunda en optimize sonucun; 10^7 hücre/mL, statik, 120 dk adezyon süresi ve 72 saat biyofilm olgunlaşma süresi olduğunu saptadık.

Elde ettiğimiz sonuçlar, Di Bonaventura ve ark. [28]'in yapmış olduğu optimizasyon çalışması ile karşılaştırıldığında en optimize biyofilm olgunlaşma süresi olarak verdikleri 72 saat ile uyumlu, fakat çalışmamızda saptadığımız 10^7 hücre/mL'lik ve 120dk adezyon süresi, onların çalışmasındaki 10^5 hücre/mL'lik optimize inokulum miktarı ve 60 dakikalık adezyon süresi ile uyumlu değildir. Iturrieta-González ve ark. [9]'ın çalışması ise çalışmamızdaki 10^7 hücre/mL'lik inokulum miktarı ile uyumludur. Bu çalışmada en optimize koşullar olarak saptanmış olan 90 dakikalık inkübasyon süresi, 48 saatlik biyofilm olgunlaşma süresi ve deneyin çalkalamalı düzenekte gerçekleştirilmesi ise bizim çalışmamızdaki 120 dakikalık adezyon süresi, 72 saatlik biyofilm olgunlaşma süresi ve statik düzenek olması ile uyumlu değildir. Ayrıca bu çalışmada çalkalama hızı 75 rpm olarak uygulanmış, biz ise çalkalama hızını 100 rpm olarak uyguladık. Montoya ve ark. [2] ise çalışmalarında adezyon süresinin 2-4 saat arasının daha optimize olduğunu saptamışlardır ve biz de çalışmamızda 120 dakikayı en optimize adezyon süresi olarak tespit ettik, dolayısıyla çalışmamız bu parametre açısından bu çalışma ile uyumludur.

Dünyada bu amaçla yapılmış olan optimizasyon çalışmalarında *T. asahii* biyofilm oluşturma sürecinin farklı şartlarda gerçekleştiği görülmektedir. Ülkemizde gerçekleştirdiğimiz bu optimizasyon çalışması çalışmamızın devamında bize yol gösterici olmuştur. Ayrıca bu konuda yapılacak olan daha sonraki çalışmalara da öncülük edeceği kanaatindeyiz.

Çalışmamızda kristal viyole yöntemiyle daha önceden belirlediğimiz optimize deney düzeneğini uygulayarak tüm kökenlerimizin biyofilm düzeylerini belirledik. Burada amacımız tüm kökenleri biyofilm düzeylerine göre gruplandırmak ve daha sonra protein miktarları ve antifungal duyarlılık profilleri ile karşılaştırmaktır.

Iturrieta-González ve ark. [9] Brezilya’da yaptıkları biyofilm çalışmasında *Trichosporon* türlerinde absorbans değerini 0,109-3,337 bulmuş olup, $A_{570} < 1,0$ ise düşük düzey, $1,0 \leq A_{570} \leq 2,499$ ise orta düzey ve $2,5 < A_{570}$ ise yüksek düzey olarak rastgele sınıflandırmıştır. Montoya ve ark. [2] ise Meksika’da hastalardan izole ettikleri 49 adet *T. asahii* kökeninde kristal viyole yöntemi ile yaptıkları biyofilm oluşumu araştırmasında $A_{595} \leq 0,531$ ise düşük düzey, $0,531 < A_{595} < 0,763$ ise orta düzey, $0,764 < A_{595} < 0,999$ ise yüksek düzey ve $1,0 \leq A_{595}$ ise çok yüksek düzey olarak sınıflandırmışlardır. Bir başka biyofilm çalışmasında ise kristal viyole yöntemine göre yapılan sınıflandırmada statik ortamda olanlar $A_{550} < 0,1$ ise düşük düzey, $0,15 < A_{550}$ ise yüksek düzey, çalkalamalı ortamda ise $A_{550} < 0,1$ ise düşük düzey, $0,4 < A_{550}$ ise yüksek düzey diye ayırmıştır [1]. Türkiye’de ise yapılan bir biyofilm çalışmasında modifiye tüp adherans yöntemi kullanılarak biyofilm pozitifliği değerlendirilmiştir [14]. Bu çalışmada tüplerde 48 saat inkübe edilen *T. asahii* kökenleri %1’lik safranin ile boyandıktan sonra yıkanıp, kurutularak, oluşan tabakanın kalınlığı, pozitif kontrol olarak kullanılan *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 kökeninin oluşturduğu biyofilm ile gözle karşılaştırılarak, zayıf (+) pozitif, orta (++) pozitif ve kuvvetli (+++) pozitif olarak değerlendirilmiştir [14].

Çalışmamızda tespit ettiğimiz biyofilm absorbans değerleri 0,067 ile 3,889 aralığı arasındadır. Kökenlerin biyofilm düzeylerini ise, $A_{570} < 1,0$ ise düşük düzey, $1,0 \leq A_{570} \leq 2,2$ ise orta düzey ve $2,2 < A_{570}$ ise yüksek düzey biyofilm oluşturanlar şeklinde gruplandırdık. Elde ettiğimiz verileri Iturrieta-González ve ark. [9] yaptığı biyofilm çalışmasına benzer şekilde sınıflandırdıktan sonra, biyofilm düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu gösterdik. Montoya ve ark. [2] ise 49 adet hasta kökenini dahil etmiştir, bu çalışmada köken sayısı bizim köken sayımızdan fazla ve yaptıkları sınıflandırma da bizim sınıflandırmamız ile uyumsuzdur. Kurakado ve ark. [1]’in yapmış olduğu sınıflandırmada ise $A_{550} < 0,1$ ise düşük düzey, $0,4 < A_{550}$ ise yüksek düzey olarak sınıflandırmışlardır ve bizim sonuçlarımız ile

uyumsuzdur. Dag ve Cerikcioğlu [14] yapmış oldukları çalışmada ise son zamanlarda en sık kullanılan biyofilm oluşumu yöntemi olan kristal viyole yöntemi kullanılmamış olup modifiye tüp adherans yöntemini kullanmışlardır.

Diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi mantarlarda da biyofilm oluşumunun ilk basamağı adezyondur ve bu yapışma sürecinden sonra filamentleşme ile biyofilmin olgun faza geçmektedir [1, 3]. Mantarlarda GAPDH'nin bir adezyon faktörü olarak rol oynaması biyofilm oluşumunda etkili olduğunu gösterilmiştir. Ichikawa ve ark. [3]'ün yapmış olduğu çalışmada üç adet *T. asahii* kökeninde adezyonda artrokonidyanın anahtar rol oynadığı ve yüzeylerinde GAPDH bulunduğu belirtilmiş olup adezyon ne kadar artarsa GAPDH miktarının da o kadar arttığı görülmüştür [3, 41, 43]. Bu çalışma dışında hem uluslararası hem de ulusal literatürde GAPDH ve *Trichosporon asahii* biyofilm düzeylerini karşılaştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmamızda biyofilm oluşumu ve GAPDH miktarı arasındaki korelasyonu da araştırdık ve pearson korelasyonu $r = 0,7058$ (%71), $p < 0,0001$ olarak saptadık. Böylece; biyofilm oluşumu ve GAPDH miktarı arasında pozitif eğilimli bir korelasyon olduğunu ve kökenlerin biyofilm düzeylerinin arttıkça, GAPDH düzeylerinin de arttığını tespit ettik. Ayrıca kökenler düşük, orta ve yüksek düzey biyofilm olmak üzere üç gruba ayrıldığında ise bu grupların GAPDH miktarları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu da gösterdik.

Literatürde *Trichosporon* biyofilm düzeyleri ve antifungal duyarlılık profillerinin karşılaştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Di Bonaventura ve ark. [28] yaptıkları çalışmada AMB için logaritmik artışı 6-8 $\mu\text{g/mL}$ $\log_2$ ve FLC için 3-9 $\mu\text{g/mL}$ $\log_2$ olarak belirlemişlerdir. Iturrieta-González ve ark. [9] ise 36 *T. asahii* kökeninde biyofilm oluşturan hücrelerde AMB için MIK_{50} ve MIK_{90} 'ı >32 , FLC için ise MIK_{50} ve MIK_{90} 'ı >1024 olarak bulmuşlardır. Montoya ve ark. [2] 48 *T. asahii* Meksika kökeni ile yaptıkları çalışmada, AMB için $\geq 2\mu\text{g/mL}$ $\log_2$ ve FLC için $\geq 8\mu\text{g/mL}$ $\log_2$ olarak belirlemişlerdir. Lara ve ark. [56]'nın yaptığı çalışma bu konuda yapılan en son çalışmalardan biri olup, 59 *Trichosporon* türünde, AMB için logaritmik artışın 4-66 $\mu\text{g/mL}$ $\log_2$ olduğunu belirtmişlerdir.

İnceleyebildiğimiz kadarıyla Türkiye'de *Trichosporon* biyofilmleri ve antifungal düzeyleri ile ilgili çalışmalara rastlayamadık.

Biz ise çalışmamızda antifungal duyarlılık testi sonucunda AMB için, planktonik hücrelerde MİK aralığını 0,25-4 µg/mL, MİK₅₀ ve MİK₉₀ 2µg/mL, GM 1,48 µg/mL olarak saptarken, biyofilm oluşturan hücrelerde MİK aralığını 2-16 µg/mL, MİK₅₀ 4 ve MİK₉₀ 8µg/mL, GM 3,25µg/mL olarak saptadık. Flukonazol için planktonik hücrelerde MİK aralığını 0,125-2 µg/mL, MİK₅₀ 0,5 ve MİK₉₀ 2µg/mL, GM 0,42 µg/mL şeklinde saptarken, biyofilm oluşturan hücrelerde MİK aralığını 2-2048 µg/mL, MİK₅₀ 256 ve MİK₉₀ 1024µg/mL, GM 189,6µg/mL olarak saptadık. Posakonazol için ise planktonik hücrelerde MİK aralığını 0,03-0,5 µg/mL, MİK₅₀ 0,06 ve MİK₉₀ 0,25µg/mL, GM 0,08 µg/mL, biyofilm oluşturan hücrelerde ise MİK aralığını 0,5-512 µg/mL, MİK₅₀ ve MİK₉₀ 512µg/mL, GM 101,6µg/mL olarak saptadık. İncelenen üç antifungal için de biyofilm oluşturan hücrelerin, planktonik hücrelere göre daha yüksek MİK değerlerine (MİK₅₀, MİK₉₀ ve GM) sahip olduğunu belirledik.

Hasta kökenlerinin tamamında planktonik hücrelerin MİK sonuçları ile biyofilm oluşturmış hücrelerinin MBK₅₀ ve MBK₈₀ sonuçları karşılaştırıldığında ise AMB MİK-MBK₅₀ ve MİK-MBK₈₀ arasında anlamlı fark bulamadık, fakat, FLC MİK-MBK₈₀ ve POS MİK-MBK₈₀ arasında anlamlı fark saptadık. Bunun üzerine planktonik hücre MİK ve biyofilm oluşturan hücre MBK₈₀'ler arasındaki log₂ bakılmış AMB'de kökenlerin %30'unda log₂ gözlemlenemedi ve log₂ aralıkları; AMB için 0-4 µg/mL log₂, FLC için 3-13 µg/mL log₂ ve POS için 1-14 µg/mL log₂ olarak belirlendi.

Di Bonaventura ve ark. [28]'ın yaptıkları çalışmada AMB için 6-8 µg/mL log₂ ve FLC için 3-9 µg/mL log₂ olarak belirlemişlerdir ve bizim çalışmamız ile karşılaştırdığımızda, AMB log₂ uyumsuz olup FLC log₂ benzer sonuçlar sergilemiştir. Iturrieta-González ve ark. [9] ise 36 *T. asahii* kökeninde biyofilm oluşturan hücrelerde AMB için MİK₅₀ ve MİK₉₀'ı >32, FLC için ise MİK₅₀ ve MİK₉₀'ı >1024 olarak bulmuş olup, bizim çalışmamız ile karşılaştırdığımızda, AMB için uyumsuz, FLC için ise benzer olduğu görüldü. Montoya ve ark. [2] 48 *T. asahii* Meksika kökeni ile yaptıkları çalışmada, AMB için ≥2µg/mL log₂ ve FLC için ≥8µg/mL log₂ olarak belirlemişlerdir ve çalışmamız ile karşılaştırdığımızda, AMB log₂ ve FLC log₂ benzer sonuçlar olduğu görülmüştür. Lara ve ark. [56]'nın yaptıkları çalışmada 59 *Trichosporon* türünde, AMB için 4-66 µg/mL log₂ olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuç diğer sonuçlara ve bizim sonuçlarımıza göre oldukça yüksektir.

Literatürde inceleyebildiğimiz kadarıyla *T. asahii* kökenlerinde, biyofilm oluşturan hücrelerde, POS için MİK sonuçlarını inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Biz ise çalışmamızda POS ile ilgili olarak da çalıştık. Kökenlerin %73,33'ünde POS MİK'inde

logaritmik artış $14 \geq \log_2 \geq 10$ iken, kökenlerin %40'ında FLU MİK'inde $13 \geq \log_2 \geq 10$ artış olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar antifungal değerlendirmeleri yapılırken yeni triazollerin, özellikle POS için de antifungal duyarlılık testlerinin yapılması gerektiğini ve biyofilm oluşturan enfeksiyonlarda kullanımının maalesef kısıtlanmakta olduğunu göstermektedir.

Ayrıca planktonik hücre ve biyofilm oluşturan hücre arasındaki antifungal MİK $\log_2$ değerleri ile biyofilm düzeyleri ve GAPDH miktarları arasında anlamlı bir korelasyon olmadığını saptadık. Bu durum, biyofilm oluşumundaki MİK değerlerindeki artışın sadece GAPDH enzimidaki artıştan kaynaklanmadığını ve başka etkenler de olabileceğini göstermektedir. Biyofilm oluşumu ve GAPDH arasında korelasyon olması ise GAPDH miktarının biyofilm düzeyini pozitif yönde etkilediği fakat biyofilm düzeyini belirlerken sadece GAPDH enzim miktarının araştırılmasının yeterli olmadığını ve bu konuyla ilgili daha ileri düzeyde çalışmaların yapılması gerektiğini göstermektedir.

Çalışmamızda kökenleri klinik örneklerle göre idrar, yüzeysel ve diğer olarak gruplara ayırdıktan sonra bu gruplar arasında biyofilm düzeyleri (O.D.), GAPDH düzeyleri (alan) ve üç antifungalın (AMB, FLC ve POS) MİK değerleri, MBEK80 değerleri ve bu ikisi arasındaki $\log_2$ değerlerine göre fark olup olmadığına baktık ve sonuç olarak sadece anlamlı farkın FLC MİK değerleri arasında olduğunu bulduk ve hem idrar kökenleri ve hem de diğer kökenler yüzeysel kökenlerden daha yüksek FLC MİK değerlerine sahipti. Klinik örneklerle göre biyofilm düzeylerinde bir fark saptayamadık benzer şekilde dağılım göstermekteydi. Iturrieta-González ve ark. [9]'ın çalışmasında ise yüzeysel kökenlerin, kan kökenlerine göre daha fazla biyofilm oluştuğu tespit etmiştir, bizim çalışmamız, bu çalışma ile uyumsuzdu. Sonuç olarak çalışmamızda numune türünün biyofilm oluşumuna etkisinin olmadığını belirledik.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde dünyada gerçekleştirilen *T. asahii* biyofilm oluşumu optimizasyon çalışmalarında, biyofilm üretim sürecinin farklı şartlarda yürütüldüğü ve her çalışmada, farklı ülkelerde, farklı miktarlarda ve sürelerde biyofilmlerin oluştuğu bildirilmektedir. İnceleyebildiğimiz kadarıyla Türkiye’de bu konuda yapılan çalışmalarda optimizasyon deneyleri yapılmamıştır. Bu çalışma öncesinde gerçekleştirdiğimiz optimizasyon deneyleri sonucunda 10^7 hücre/mL, statik, 120dk adezyon süresi ve 72 saat’lik sonucu en optimize ve tekrarlanabilir sonuçlar olarak belirledik. Ülkemizde ilk kez tarafımızdan belirlenmiş bu sonuçların, bu konuda yapılacak olan daha sonraki çalışmalara ışık tutacağı ve kullanılabileceği kanaatindeyiz.

Çalışmamızda, biyofilm oluşumu ve GAPDH miktarı arasında pozitif eğilimli bir korelasyon olduğunu ve kökenlerin biyofilm düzeylerinin arttıkça, GAPDH düzeylerinin de arttığını saptadık. Kökenler düşük, orta ve yüksek düzey biyofilm olmak üzere üç gruba ayrıldığında ise bu grupların GAPDH miktarları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterdik.

Yaptığımız antifungal duyarlılık testi sonucunda biyofilm oluşturan hücrelerin, planktonik hücrelere göre daha yüksek MİK değerlerine (MİK₅₀, MİK₉₀ ve GM) sahip olduklarını belirledik.

Literatürde inceleyebildiğimiz kadarıyla *T. asahii* kökenlerinde, biyofilm oluşturan hücrelerde, POS için MİK sonuçlarını inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlamadık ve biz bu çalışmamızda POS sonuçlarını da dünyada ve Türkiye’de ilk kez saptamış olduk. Ayrıca kökenlerin %73,33’ünde POS MİK’inde logaritmik artışın $14 \geq \log_2 \geq 10$ olduğunu gösterdik. Bu sonuçlar bize antifungal değerlendirilmesi yapılırken yeni triazollerden biri olan POS için de mutlaka antifungal duyarlılık testlerinin yapılması gerektiğini ve biyofilm oluşturan *T. asahii* enfeksiyonlarının tedavisinde maalesef POS’un kullanımının kısıtlandığını göstermektedir.

Ayrıca planktonik hücre ve biyofilm oluşturan hücre arasındaki antifungal MİK $\log_2$ değerleri ile biyofilm düzeyleri ve GAPDH miktarları arasında anlamlı bir korelasyon olmadığını belirledik. Bu durum, biyofilm oluşumundaki MİK değerlerindeki artışın sadece

GAPDH enzimidaki artıştan kaynaklanmadığını ve başka etkenler de olabileceğini göstermektedir. Biyofilm oluşumu ve GAPDH arasında korelasyon olması ise GAPDH miktarının biyofilm düzeyini pozitif yönde etkilediği fakat biyofilm düzeyini belirlerken sadece GAPDH enzim miktarına bakmanın yeterli olmadığını ve bu konuyla ilgili daha sonraki çalışmaların yapılması gerektiğini göstermektedir.

Klinik örneklerle göre kökenlerin biyofilm düzeyleri ve GAPDH düzeylerinde anlamlı bir fark bulamadık. Sonuç olarak numune türünün biyofilm oluşumuna etkisinin olmadığını belirledik.

T. asahii'nin patogeneğinde rol oynayan biyofilm oluşum mekanizmasının aydınlatılmasının daha farklı tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ve uygulanmasına olanak sağlayacağını düşünmekteyiz. Bu sebeple bu çalışmaların artırılmasının, literatüre önemli katkılar sağlayacağını kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- [1]. Kurakado, S., Miyashita, T., Chiba, R., Sato, C., Matsumoto, Y. ve Sugita, T., 2021, Role of arthroconidia in biofilm formation by *Trichosporon asahii*, *Mycoses*, 64 (1), 42-47.
- [2]. Montoya, A. M., Elizondo-Zertuche, M., Treviño-Rangel, R. J., Becerril-García, M. ve González, G. M., 2018, Biofilm formation and antifungal susceptibility of *Trichosporon asahii* isolates from Mexican patients, *Revista Iberoamericana de Micología*, 35 (1), 22-26.
- [3]. Ichikawa, T., Yoshiyama, N., Ohgane, Y. ve Ikeda, R., 2015, Switching of colony morphology and adhesion activity of *Trichosporon asahii* clinical isolates, *Med Mycol*, 54 (2), 189-196.
- [4]. Ayaz, S., Çerikçioğlu, N. ve Görçin Karatekir, Ş., 2019, Genotyping and Antifungal Susceptibility of *Trichosporon asahii* Strains Isolated from the Clinical Samples in a University Training and Research Hospital in Turkey, *Infect Dis Clin Microbiol* 1(2), 78-86.
- [5]. Cordeiro, R. A., Pereira, L. M. G., De Sousa, J. K., Serpa, R., Andrade, A. R. C., Portela, F. V. M., Evangelista, A. J. J., Sales, J. A., Aguiar, A. L. R. ve Mendes, P. B. L., 2019, Farnesol inhibits planktonic cells and antifungal-tolerant biofilms of *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin*, *Medical mycology*, 57 (8), 1038-1045.
- [6]. Montoya Mendoza, A. M. ve González González, G. M., 2014, *Trichosporon* spp.: an emerging fungal pathogen, *Medicina universitaria*, 16 (62), 37-43.
- [7]. Hazirolan, G., 2012, An overview on *Trichosporon asahii* and its infections, *Mikrobiyol Bul*, 46 (4), 707-15.
- [8]. Valle, R. S., Ramos, L. S., Reis, V. J., Ziccardi, M., Dornelas-Ribeiro, M., Sodre, C. L., Branquinha, M. H. ve Santos, A. L. S., 2017, *Trichosporon asahii* secretes a 30-kDa aspartic peptidase, *Microbiol Res*, 205 66-72.
- [9]. Iturrieta-González, I. A., Padovan, A. C. B., Bizerra, F. C., Hahn, R. C. ve Colombo, A. L., 2014, Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B, *PLoS One*, 9 (10), e109553.
- [10]. Castano, G., Yarrarapu, S. N. S. ve Mada, P. K. 2023. *Trichosporonosis*. *StatPearls*. Treasure Island (FL).

- [11]. Gueho, E., Smith, M. T., De Hoog, G. S., Billon-Grand, G., Christen, R. ve Batenburg-Van Der Vegte, W. H., 1992, Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 61 (4), 289-316.
- [12]. Karabulut, S., 2017, *Klinik örneklerden izole edilen trichosporon asahii türü mantarların genotiplendirilmesi ve antifungal duyarlılığının belirlenmesi*, Yüksek Lisans, Marmara Üniversitesi.
- [13]. Colombo, A. L., Padovan, A. C. ve Chaves, G. M., 2011, Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis, *Clin Microbiol Rev*, 24 (4), 682-700.
- [14]. Dag, A. ve Cerikcioglu, N., 2006, Investigation of some virulence factors of *Trichosporon asahii* strains isolated from the clinical samples of hospitalized patients, *Mikrobiyol Bul*, 40 (3), 225-35.
- [15]. De Andrade, I. B., Figueiredo-Carvalho, M. H. G., Chaves, A., Coelho, R. A., Almeida-Silva, F., Zancoppe-Oliveira, R. M., Frases, S., Brito-Santos, F. ve Almeida-Paes, R., 2023, Metabolic and phenotypic plasticity may contribute for the higher virulence of *Trichosporon asahii* over other *Trichosporonaceae* members, *Mycoses*, 66 (5), 430-440.
- [16]. Yang, X., Xia, Z., Liao, Y., Zhang, D., Li, H., Zheng, H., Ao, J., Yang, R. ve Zhang, M., 2021, Proteomic analysis of serial isolates of *Trichosporon asahii* identifies host-specific adaptations using the TMT/MRM approach, *J Proteomics*, 245 104309.
- [17]. Sugita T., Nishikawa A. ve Shinoda T., 1998, Identification of *Trichosporon asahii* by PCR Based on Sequences of the Internal Transcribed Spacer Regions. *J Clin Microbiol*, 36(9), 2742-2744.
- [18]. Sugita, T., Ikeda, R., ve Nishikawa, A, 2004, Analysis of *Trichosporon* isolates obtained from the houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Journal of clinical microbiology*, 42(12), 5467–5471.
- [19]. Parashar, A., Rastogi, V., Prakash, H., Pandey, A. ve Rudramurthy, S. M., 2023, Intergenic spacer (IGS-1) region sequence-based identification, genotypic analysis, and antifungal susceptibility of clinical *Trichosporon* species. *Indian journal of medical microbiology*, 45, 100390.
- [20]. Desnos-Ollivier, M., Maufrais, C., Pihet, M., Aznar, C., Dromer, F., ve French Mycoses Study Group, 2020, Epidemiological investigation for grouped cases of *Trichosporon asahii* using whole genome and IGS1 sequencing, *Mycoses*, 63(9), 942–951.

- [21]. Sugita, T., Nakajima, M., Ikeda, R., Matsushima, T., ve Shinoda, T., 2002, Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *Journal of clinical microbiology*, 40(5), 1826–1830.
- [22]. Rodriguez-Tudela, J. L., Gomez-Lopez, A., Alastruey-Izquierdo, A., Mellado, E., Bernal-Martinez, L., & Cuenca-Estrella, M., 2007, Genotype distribution of clinical isolates of *Trichosporon asahii* based on sequencing of intergenic spacer 1. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 58(4), 435–440.
- [23]. Kalkanci, A., Sugita, T., Arikan, S., Yucesoy, M., Ener, B., Otag, F., Kiraz, N., Kustimur, S., Sancak, B., Evci, C. ve Emektas, G., 2010, Molecular identification, genotyping, and drug susceptibility of the basidiomycetous yeast pathogen *Trichosporon* isolated from Turkish patients, *Med Mycol*, 48 (1), 141-6.
- [24]. Demir, F. ve Kustimur, S., 2014, Investigation of some virulence factors in *Trichosporon* spp. strains, *Mikrobiyol Bul*, 48 (4), 628-38.
- [25]. Ichikawa, T., Sugita, T., Wang, L., Yokoyama, K., Nishimura, K. ve Nishikawa, A., 2004, Phenotypic switching and beta-N-acetylhexosaminidase activity of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii*, *Microbiol Immunol*, 48 (4), 237-42.
- [26]. Karashima, R., Yamakami, Y., Yamagata, E., Tokimatsu, I., Hiramatsu, K. ve Nasu, M., 2002, Increased release of glucuronoxylomannan antigen and induced phenotypic changes in *Trichosporon asahii* by repeated passage in mice, *J Med Microbiol*, 51 (5), 423-432.
- [27]. Kontoyiannis, D. P., Torres, H. A., Chagua, M., Hachem, R., Tarrand, J. J., Bodey, G. P., ve Raad, I. I., 2004, *Trichosporonosis* in a tertiary care cancer center: risk factors, changing spectrum and determinants of outcome. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 36(8), 564–569.
- [28]. Di Bonaventura, G., Pompilio, A., Picciani, C., Iezzi, M., D'antonio, D. ve Piccolomini, R., 2006, Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50 (10), 3269-3276.
- [29]. Sardi, J.de C., Pitangui, N.de S., Rodríguez-Arellanes, G., Taylor, M. L., Fusco-Almeida, A. M., ve Mendes-Giannini, M. J., 2014, Highlights in pathogenic fungal biofilms. *Revista iberoamericana de micologia*, 31(1), 22–29.
- [30]. Bozo, A., Doman, M., Majoros, L., Kardos, G., Varga, I. ve Kovacs, R., 2016, The in vitro and in vivo efficacy of fluconazole in combination with farnesol against *Candida albicans* isolates using a murine vulvovaginitis model, *J Microbiol*, 54 (11), 753-760.

- [31]. Fernandes Costa, A., Evangelista Araujo, D., Santos Cabral, M., Teles Brito, I., Borges De Menezes Leite, L., Pereira, M. ve Correa Amaral, A., 2019, Development, characterization, and in vitro-in vivo evaluation of polymeric nanoparticles containing miconazole and farnesol for treatment of vulvovaginal candidiasis, *Med Mycol*, 57 (1), 52-62.
- [32]. Kuhn, D. M., Balkis, M., Chandra, J., Mukherjee, P. K. ve Ghannoum, M. A., 2003, Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism, *J Clin Microbiol*, 41 (1), 506-8.
- [33]. Melo, A. S., Bizerra, F. C., Freymuller, E., Arthington-Skaggs, B. A. ve Colombo, A. L., 2011, Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex, *Med Mycol*, 49 (3), 253-62.
- [34]. Branchini, M. L., Pfaller, M. A., Rhine-Chalberg, J., Frempong, T. ve Isenberg, H. D., 1994, Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*, *J Clin Microbiol*, 32 (2), 452-6.
- [35]. Fan, Y., He, H., Dong, Y. ve Pan, H., 2013, Hyphae-specific genes HGC1, ALS3, HWP1, and ECE1 and relevant signaling pathways in *Candida albicans*, *Mycopathologia*, 176 (5-6), 329-35.
- [36]. Grald, A., Yargosz, P., Case, S., Shea, K. ve Johnson, D. I., 2012, Small-molecule inhibitors of biofilm formation in laboratory and clinical isolates of *Candida albicans*, *J Med Microbiol*, 61 (Pt 1), 109-114.
- [37]. Sudbery, P. E., 2011, Growth of *Candida albicans* hyphae, *Nat Rev Microbiol*, 9 (10), 737-48.
- [38]. Biswas, K. ve Morschhauser, J., 2005, The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*, *Mol Microbiol*, 56 (3), 649-69.
- [39]. Tsao, C. C., Chen, Y. T. ve Lan, C. Y., 2009, A small G protein Rhb1 and a GTPase-activating protein Tsc2 involved in nitrogen starvation-induced morphogenesis and cell wall integrity of *Candida albicans*, *Fungal Genet Biol*, 46 (2), 126-36.
- [40]. Wang, Y., Tang, L. J., Peng, X., Zhang, Z. B., Yang, H. L., Yan, R. M. ve Zhu, D., 2020, Transcriptome analysis of the dimorphic transition induced by pH change and lipid biosynthesis in *Trichosporon cutaneum*, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 47 (1), 49-61.

- [41]. Lau, S. K., Tse, H., Chan, J. S., Zhou, A. C., Curreem, S. O., Lau, C. C., Yuen, K. Y. ve Woo, P. C., 2013, Proteome profiling of the dimorphic fungus *Penicillium marneffei* extracellular proteins and identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an important adhesion factor for conidial attachment, *FEBS J*, 280 (24), 6613-26.
- [42]. Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T. W. ve Sawa, A., 2011, The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments, *Cell Signal*, 23 (2), 317-23.
- [43]. Crowe, J. D., Sievwright, I. K., Auld, G. C., Moore, N. R., Gow, N. A. ve Booth, N. A., 2003, *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins, *Mol Microbiol*, 47 (6), 1637-51.
- [44]. Waingeh, V. F., Gustafson, C. D., Kozliak, E. I., Lowe, S. L., Knull, H. R. ve Thomasson, K. A., 2006, Glycolytic enzyme interactions with yeast and skeletal muscle F-actin, *Biophys J*, 90 (4), 1371-84.
- [45]. Arendrup, M. C., Boekhout, T., Akova, M., Meis, J. F., Cornely, O. A., Lortholary, O., European Society of Clinical Microbiology Infectious Diseases Fungal Infection Study Group ve European Confederation of Medical Mycology, 2014, ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections, *Clin Microbiol Infect*, 20 (Suppl 3), 76-98.
- [46]. Marine, M., Brown, N. A., Riano-Pachon, D. M. ve Goldman, G. H., 2015, On and Under the Skin: Emerging Basidiomycetous Yeast Infections Caused by *Trichosporon* Species, *PLoS Pathog*, 11 (7), e1004982.
- [47]. Thibeault, R., Champagne, M., De Repentigny, L., Fournet, J. C., Tapiero, B., Moghrabi, A. ve Ovetchkine, P., 2008, Fatal disseminated *Trichosporon asahii* infection in a child with acute lymphoblastic leukemia, *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 19 (2), 203-5.
- [48]. Trevino-Rangel Rde, J., Lopez, L. J., Palma-Nicolas, J. P., Hernandez-Bello, R., Gonzalez, J. G. ve Gonzalez, G. M., 2014, Therapeutic efficacy of posaconazole in a murine model of disseminated trichosporonosis, *J Antimicrob Chemother*, 69 (4), 1075-8.
- [49]. Mulè, A., Rossini, F., Sollima, A., Lenzi, A., Fumarola, B., Amadasi, S., Chiari, E., Lorenzotti, S., Saccani, B., Van Hauwermeiren, E., Lanza, P., Matteelli, A., Castelli, F., ve Signorini, L., 2023, *Trichosporon asahii* Infective Endocarditis of Prosthetic Valve: A Case Report and Literature Review. *Antibiotics*, 12(7), 1181.
- [50]. Boutin, C. A. ve Luong, M. L., 2024, Update on therapeutic approaches for invasive fungal infections in adults, *Therapeutic advances in infectious disease*, 11, 20499361231224980.

- [51]. Shoham, S., Dominguez, E. A., ve AST Infectious Diseases Community of Practice, 2019, Emerging fungal infections in solid organ transplant recipients: Guidelines of the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice, *Clinical transplantation*, 33(9), e13525.
- [52]. Li, H., Guo, M., Wang, C., Li, Y., Fernandez, A. M., Ferraro, T. N., Yang, R., ve Chen, Y., 2020, Epidemiological study of *Trichosporon asahii* infections over the past 23 years, *Epidemiology and Infection*, 148, e169.
- [53]. Kuo, S. H., Lu, P. L., Chen, Y. C., Ho, M. W., Lee, C. H., Chou, C. H., ve Lin, S. Y., 2021, The epidemiology, genotypes, antifungal susceptibility of *Trichosporon* species, and the impact of voriconazole on *Trichosporon* fungemia patients, *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, 120(9), 1686–1694.
- [54]. Rodriguez-Tudela, J. L., Diaz-Guerra, T. M., Mellado, E., Cano, V., Tapia, C., Perkins, A., Gomez-Lopez, A., Rodero, L., ve Cuenca-Estrella, M., 2005, Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(10), 4026–4034.
- [55]. Chen, S. C., Perfect, J., Colombo, A. L., Cornely, O. A., Groll, A. H., Seidel, D., Albus, K., de Almedia, J. N., Jr, Garcia-Effron, G., Gilroy, N., Lass-Flörl, C., Ostrosky-Zeichner, L., Pagano, L., Papp, T., Rautemaa-Richardson, R., Salmanton-García, J., Spec, A., Steinmann, J., Arikian-Akdagli, S., Arenz, D. E., Sprute, R., Duran-Graeff, L., Freiburger, T., Girmenia, C., Harris, M., Kanj, S. S., Roudbary, M., Lortholary, O., Meletiadiis, J., Segal, E., Tuon, F. F., Wiederhold, N., Bicanic, T., Chander, J., Chen, Y. C., Hsueh, P. R., Ip, M., Munoz, P., Spriet, I., Temfack, E., Thompson, L., Tortorano, A. M., Velegraki, A., Govender, N. P., 2021, Global guideline for the diagnosis and management of rare yeast infections: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM, *The Lancet, Infectious diseases*, 21(12), e375–e386.
- [56]. Lara, B. R., De Camargo, B. B., Paula, C. R., Monari, G. P. M., Garces, H. G., Arnoni, M. V., Silveira, M., Gimenes, V. M. F., Leite Junior, D. P., Bonfietti, L. X., Oliveira, L., Melhem, M. S. C., Auler, M., Ramos, R. T. B., Dias, A. L. T., Silva, N. C., Moreira, D., Richini-Pereira, V. B., Anversa, L. ve Ruiz, L. D. S., 2023, Aspects related to biofilm production and antifungal susceptibility of clinically relevant yeasts of the genus *Trichosporon*, *Med Mycol*, 61 (3).

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

Sinem AYAZ

**TRİCHOSPORON ASAHİİ'DE SENTEZLENEN ENZİMLERİN
BİYOFİLM OLUŞUMUNA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ ve ANTİ...**

Phd Tez
2024_İntihal
İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa

Belge Ayrıntıları

Gönderi Kimliği
trn:oid::1:3012210959

Gönderi Tarihi
18 Eyl 2024 12:14 GMT+3

İndirme Tarihi
18 Eyl 2024 12:26 GMT+3

Dosya Adı
doktora_tez_son_18.09.2024_Sinem_Ayaz_.docx

Dosya Boyutu
5.6 MB

69 Sayfa

15.208 Sözcük

99.102 Karakter



Sayfa 1 of 75 - Kapak Sayfası

Gönderi Kimliği trn:oid::1:3012210959



Sayfa 2 of 75 - Bütünlük Genel Bakış

Gönderi Kimliği trn:oid::1:3012210959

6% Genel Benzerlik

Her veri tabanı için çıkarılan kaynaklar da dâhil tüm eşleşmelerin kombine toplamı.

Rapordan Filtrelenen

- Bibliyografya
- Alıntılanan Metin

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

- ☐ Etik Kurul izni gerekmektedir.
- ☒ Etik Kurul izni gerekmemektedir.

SİNEM AYAZ
(İmza)



KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

- ☐ Kurum izni gerekmektedir.
- ☒ Kurum izni gerekmemektedir.

Öğrenci Adı SOYADI
(İmza)

SİNEM AYAZ