



**Yeni Nesil Triazole Grubu Antifungal İlaçlardan
Tioconazole Dirençlik Sağlayan Genlerin Bulunması**

Salman KOÇ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr Ahmet KOÇ

Yüksek Lisans Tezi-2020

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ NESİL TRİAZOLE GRUBU ANTİFUNGAL İLAÇLARDAN
TİOCONAZOLE DİRENÇLİLİK SAĞLAYAN GENLERİN BULUNMASI

SALMAN KOÇ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Prof.Dr.Ahmet KOÇ

Bu Araştırma BAB Tarafından TYL-2019-1748 nolu Proje,
ile desteklenmiştir

MALATYA

2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Funguslar	3
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin Sistematikteki Yeri	4
2.2.1. Fungi (alem).....	5
2.2.2. Ascomycota (şube)	6
2.2.3. Saccharomycotina (alt-şube).....	6
2.2.4. <i>Saccharomyces cerevisia</i>	6
2.3. Antifungaller	8
2.3.1. Polienler-Griseofulvin (amfoterisin b ve türevleri)	8
2.3.2. Alilamin türevleri (naftidin, terbinafin)	9
2.3.3. Ekinokandinler	10
2.3.4. Pirimidinler (Nüklezid Analoğu) 5Fulisitozin.....	10
2.3.5. Azoller	11
2.3.6. Triazoller.....	12
2.3.7. Tioconazole.....	12
2.4. Mantar Enfeksiyonlarında Tanı	14
2.4.1. Mikroskobi.....	14
2.4.2. Kültür	14

2.4.3. Serolojik yöntemler.....	15
2.4.4. Galaktoman atijen testi	15
2.4.5. 1-3-Beta-D- Glukan testi	16
2.4.6. Moleküler yöntemler.....	16
2.5. Antifungal Duyarlılık Tesleri.....	17
2.5.1. Sıvı dilüsyon testi.....	17
2.5.2. Gradient test.....	18
2.5.3. Disk difüzyon test	18
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. İlaç, Maya Suşu, Hücre Büyümesi ve gDNA Kütüphane Taraması.....	20
3.2. MIC (Minimal Inhibitory Concentration) Analizi	22
3.3. Gradyan Plaka Hazırlama ve Spotlama Analizi	22
3.4. Plazmid İzolasyonu ve Gen Klonlama.....	23
4. BULGULAR.....	25
4.1. MIC, gDNA Kütüphanesinin Taranması ve İlaç Direnci Genlerinin Belirlenmesi. 25	
4.2. Dirençlilik Genlerinin Klonlanması Ve Yabani Tip Mayada Test Edilmesi.....	26
4.3. Mutant Analizleri.....	27
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	30
KAYNAKLAR	31
EKLER.....	35
EK:1 ÖZ GEÇMİŞ.....	35
EK:2 ETİK KURUL ONAYI	36

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlemesinden tezin son aşamasına kadar bana yol gösteren, yoğun iş temposunda değerli vakitlerini ayırarak tecrübeleri, hoşgörüsü ile destek olan tez danışmanı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ahmet Koç'a

İnönü Üniversitesi BAPSİS birimine, Laboratuvar çalışmalarımın her aşamasında bana yardımcı olan ve verilerin düzenlenmesinde katkı sunan Araştırma Görevlisi Muhammed Dünder'a, Tezime katkılarından dolayı Prof. Dr. Abbas Güngördü'ye ve dönem arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bugünlere gelmemi sağlayan sevgili annem ve babam Şehriban ve Abdurrahman Koç'a, eğitim ve tezimin hazırlanması sürecinde gösterdikleri sabır, anlayış ve özveriden dolayı sevgili kızlarım Eylül Eda ve Ekin'e eşim Hülya Geçgel Koç'a teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Yeni Nesil Triazole Grubu Antifungal İlaçlardan Tioconazole Dirençlilik Sağlayan Genlerin Bulunması

Amaç Tıp alanındaki yeni gelişmeler: Kemik iliği nakli, kemoterapi, karaciğer ve böbrek transplantasyonları, yoğun bakımda tedavi gerektiren hasta sayısının artmasına neden olmaktadır. Tedavilerde kullanılan geniş spektrumlu antibiyotikler, kortikosteroitler, yoğun bakım sürecinin uzaması, organ ve doku nakillerinde organ reddini engellemek için kullanılan ümminsüpresiflere bağlı sistemik mantar enfeksiyonlarının morbidite ve mortalitesinde önemli artışa neden olmaktadır.

Hastanelerde antifungal duyarlılık testlerinin çıkması uzun sürdüğünden hastalara gerekli tedavinin verilmesinde gecikmelere ve antifungallerin etkili kullanılamamasına neden olmaktadır.

Amacımız maya mantarında uygulanabilen genetik/ genomik yöntemlerden yararlanarak mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan tioconazole karşı hücrelerin nasıl dirençlilik kazandıklarının saptamaktır.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda BY4741 *S. cerevisiae* maya suşu için YPD agar ortamında TIO için MIC dozunu belirledik. Tarama amacı ile gDNA transforme edilmiş hücreleri, ilacın öldürücü dozlarını içeren YNB plaklarına yaydık ilaca az duyarlı olan koloniden plazmitleri izole ettik. İlacın varlığında büyümeden sorumlu olduklarını kanıtlamak için taze yabancı tiplerini trasforme etmek için kullandık. Onayladıktan sonra plazmitler Yep13F1 primeri kullanılarak sekanslandı.

Bulgular: Dirençli koloninin, Maya 12. Kromozomu üzerinde bir DNA bölgesini içerdiği saptandı. Bu DNA sekans dizisi Yeast Genome Database (<https://www.yeastgenome.org>) veri tabanında BLAST analizi yapmak için kullanıldı ve YLR117w isimli gene tekabül ettiği anlaşıldı.

Sonuç Bulduğumuz YLR177w geninin aşırı ekspresyonu, TIO duyarlılığını azalttığını gözlemledik. YLR177w'nin bulunmadığı delesyon mutantını, ilacın varlığında büyüme yeteneği açısından analiz ettik ancak YLR177w yokluğunda hücrelerin TIO'ya duyarlı hale gelmediğini gözlemledik.

Anahtar Kelimeler: İlaç dirençliliği, Antifungal, Genomik, Maya

ABSTRACT

Finding Genes That Resist Thioconazole From New Generation Triazole Group Antifungal Drugs

Aim: New developments in medicine, like bone marrow transplantation, chemotherapy, and liver and kidney transplantations, cause an increase in the number of patients requiring intensive care due to the broad-spectrum antibiotics and corticosteroids used in these treatments, prolonged intensive care processes, and the morbidity and mortality of systemic fungal infections due to the immunosuppressants used to prevent organ rejection in organ and tissue transplants.

Antifungal susceptibility tests take a long time to perform, which causes delays in giving the necessary treatment to patients and promotes the ineffective use of antifungals.

Our aim is to determine how the cells become resistant to thioclosole (TIO), which is used in the treatment of fungal infections, by using genetic/genomic methods that can be applied in yeast.

Material and Method: In our study, we determined the MIC dose for TIO in YPD agar medium for the BY4741 *S. cerevisiae* yeast strain. For the purpose of screening, we spread gDNA-transformed cells on YNB plates that contained lethal doses of the drug and isolated plasmids from the isolates that were less sensitive to the drug. We used it to transform fresh wild-types to prove that they were responsible for the growth in the presence of the drug. After confirmation, the plasmids were sequenced using the Yep13F1 primer.

Results: The resistant colony was found to contain a DNA region on the 12th Chromosome of Maya. This DNA sequence was used to perform a BLAST analysis in the Yeast Genome Database (<https://www.yeastgenome.org>) and it was found to correspond to the gene named YLR117w.

Conclusion: We observed that overexpression of the YLR177w gene reduced TIO sensitivity. We analyzed the deletion mutant without YLR177w in terms of its ability to grow in the presence of the drug, but we observed that cells were not susceptible to TIO in the absence of YLR177w.

Keywords: Drug Resistance, Antifungals, Genomics, Yeast

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome(Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği)
BG	: 1-3 beta-D glukon
CFU	: Colony Forming Units (Mililitredeki koloni sayısı)
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GM	: Galaktomannan antijeni
GVHD	: Graft Versus Host Hastalığı
HIV	: Human Immunodeficiency Virus(İnsan Bağışıklık Yetmezliği)
Kb	: Kilo baz
Kbç	: Kromozom uzunluğu
LB	: Luria-Bertani
M	: Molar
Mb	: Mega baz
MFK	: Minimum Fungisidal Konsantrasyon
MIK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
mL	: Mililitre
Mm	: Milimol
OD	: Optical Density(optik yoğunluk)
PCR	: Polymerase chain reaction(Polimreaz zincir reaksiyonu)
PEG	: Polietilen glikol
PH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu

PNA-FISH	: Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization
QS	: Quorum sensing
RNA	: Ribonükleik asit
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
SGD	: <i>Saccharomyces</i> Genom Database
SSS	: Santral Sinir Sistemi
TE	: Tris-EDTA
TIO	: Tioconazole
YNB	: Yeast Nitrogen Base
YPD	: Yeast extract pepton dextrose
μL	: Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekiller No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Tioconazolenin kimyasal formülü (Sigma-Aldrich).	13
Şekil 4.1. Elde edilen DNA dizisi BLAST analizi	26
Şekil 4.2. TIO direnç geni için spotlama analizi	27



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2. 1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> canlı sınıflandırmasındaki yeri	5
Tablo 2. 2. <i>S. cerevisiae</i> 'nın genetik özellikleri.....	7
Tablo 2. 3. <i>S. cerevisiae</i> 'nın kromozom uzunlukları (Olson 1991).	8
Tablo 3. 1. Deneylerde kullanılan cihazlar	19
Tablo 3. 2. Deneylerde kullanılan kimyasallar	20

1. GİRİŞ

Tıp alanındaki yeni gelişmeler: Kemik iliği nakli, kemoterapi, karaciğer ve böbrek transplantasyonları, yoğun bakımda tedavi gerektiren hasta sayısının artmasına neden olmaktadır. Tedavilerde kullanılan geniş spektrumlu antibiyotikler, kortikostereoitler, yoğun bakım sürecinin uzaması, organ ve doku nakillerinde organ reddini engellemek için kullanılan ümminsüpresiflere bağlı sistemik mantar enfeksiyonlarının morbidite ve mortalitesinde önemli artışa neden olmaktadır (1,2).

Akdeniz üniversitesinde yapılan başarılı çift kol nakli ameliyatı sonrasında hastanın uzun süre yoğun bakımda kalması ve immün sistemin baskılanması sonucunda gelişen mantar enfeksiyonu, bu mantara karşı kullanılan ilaca direnç gelişmesi sonucu hasta yaşamını yitirmiştir. Bu gibi istenmeyen sonuçlar bu alandaki başarıyı tartışmaya neden olmuştur (3).

Sistemik antifungallerin kullanımı 1950’li yıllarda başlamış. Ancak ilaç sayısındaki artış anibakteriyal ilaçların gerisinde kalmıştır. Daha da önemlisi birçok mantar türü bu ilaçlara direnç geliştirmiştir. Tüberküloz ve HIV taşıyan hastalarda yapılan bir çalışma, hastalarda saptanan mantar enfeksiyonlarının % 34’ü Amfoterisin B’ye % 75’i azol gurubu antifungallere dirençli çıkmıştır (4).

Bakteriler prokaryotik hücre yapısında olduğundan insan hücresinden farklı yapıdadır. Dolayısı ile bakteriler farklı metabolik hedeflere sahiptir. Mantarlar konak olarak kullandığı insanlar, ökaryotik hücre yapısına sahiptir. Mantarlara toksik olan ilaçlar insan hücresine de toksik olabilmektedir (5,6). Mantarlar konak olarak kullandıkları memeli hücreleri ile aynı özellikte olması nedeni ile tedavide kullanılan ilaçların biyokimyasal ve fizyolojik farklılıklara bağlı olarak üretilmeleri son 10-15 yıl ile sınırlıdır (7,8).

Hastanelerde antifungal duyarlılık testlerinin 72 saat gibi uzun sürede çıkması gerekli tedavinin gecikmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla hastanın sağ kalım oranını etkilemektedir. İlaça karşı gelişen direnç genlerinin bulunması piyasada var olan antifungallerin etkili kullanılmasına neden olacaktır. Dolayısı ile farklı ilaç kombinasyonlarının kullanılması tedaviyi hızlandıracaktır. Bu gibi çalışmalar hücre içi hedeflerin saptanmasına olanak sağlayacaktır.

Çalışmamızda model olarak maya mantarı (*S. cerevisiae* BY4741 Hattı) kullanıldı. *S. cerevisiae* kullanmamızın sebebi hem mantar olması hem de moleküler biyoloji ve genetik yöntemlerin kolayca uygulanabilir olması etkili oldu. Dirençlilik mekanizmasını bulmak için, yüksek kopya sayılı genomik DNA (g DNA) kütüphanesi ile transforme olmuş maya hücreleri tioconazolenin öldürücü dozlarının olduğu ortamda büyümeye bırakıldı. Büyüyebilen hücrelerden elde edilen kütüphane plazmitlerinin dizi analizi yapılarak hangi geni içerdiği tespit edildi. Daha sonra bu gen klonlandı, aşırı ifade edilmesinin ve genomdan çıkarılmasının ilacın dirençlilik mekanizmasına etkisi teyit edildi. Hedefimiz yeni nesil azol gurubu antifungallerden tioconazoleye karşı gelişen direnç geninin bulunup bulunmadığını araştırmaktır. Çalışmamız sonunda elde edilen verilerin organ tranplantasyonu ve kanser hastalarında fungal enfeksiyonların engellenmesine ışık tutacağı ve sağ kalım oranını arttırılmasında katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Funguslar

Fungusların çoğu çok hücrelidir, ancak fungus gruplarının çoğunda bir hücreli türler bulunur. Bunların zigospor fungusları, kadeh fungusları ve kese fungusları mayalar olarak isimlendirilir. Mayaların çoğu tomurcuklanarak- mitozdan sonra asimetrik hücre bölünmesi ile- ürerler. Maya evrelerine sahip bazı funguslar ipliksi bir evre içerirler. Mayalar sıvı ve nemli ortamlarda yaşarlar ve besin maddelerini hücre yüzeyleriyle doğrudan absorblarlar. “Maya” terimi organizmaların tek bir taksonomik gurubunu değil, birden fazla süreçte ortaya çıkmış olan bir yaşam biçimini ifade eder. Yüksek büyüme hızları ile birlikte, çok sayıda türün kültüre alınabilme kolaylığı, laboratuvarlarda çalışmak için mayaları ideal organizmalar yapar. Labaratuvar çalışanlarına çok sayıdaki bakterinin sağladığı avantajlarının aynısını sağlarlar. Ancak ökaryot olduklarından, genomları ve hücreleri insanlarınkine ve diğer ökaryotlarınkine çok fazla benzerlik gösterir (9).

Mantar ailesinin büyük bir kısmını mayalar oluşturmaktadır. Doğada yaygın bulunan mayaların hücre yapısını; polisakkarit, lipit ve nükleik asitler oluşturur. Hücre büyüklüğüne göre mayalar, bakteriler ile yüksek mantarlar arasındadır. Maya hücre zarı; protein, lipit ve fosfattan oluşur. Maya hücresinin %75’ni su oluşturmaktadır. Geriye kalan kısmının yarısını proteinler oluşturur ve diğer kısmını da karbonhidratlar, enzimler, aminoasitler, yağlar, peptitler ve vitaminler oluşturur. Mayalarda hidrolaz ve desmolaz diye iki çeşit enzim bulunur. Hidrolazlar esterazlar, karbohidrolaz ve proteazlardan oluşur. Desmolaz enzimleri yükseltgenme ve indirgenme tepkimelerinde katalizör görevi görür. Permeaz enzimleri hücre dışı ortamda hücre içine madde taşınmasında rol alır.

Mayaların üremesini etkileyen en önemli faktörlerin başında pH, sıcaklık ve havalandırma gelir. Mayalar asidik ortamda büyürler. Ancak oksijenin bol olduğu ortamlarda hızlı ürerler. Oksijenin olmadığı ortamlarda besin maddelerini etil alkole dönüştürürler. Mayaların büyümesinde ortam şartlarının dışında ortamda bulunan besin maddeleri de etkilemektedir. Bunlar heterotrof beslendikleri için özellikle karbonhidratlar, üremelerini doğrudan etkiler. Karbonhidrat kaynakları; glikoz, sakkaroz, mannoz, galaktoz ve furuktozdur. Üremesinde diğer etkili madde azot

olmasına rağmen potasyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor gibi maddelerde ihtiyaç duyar (10).

İnsanlar için yararlı olan bir çok fungus türü ticari ve endüstriyel olarak da üretilmektedir (11). Funguslarda elde edilen metabolitler endüstride kullanılmaktadır. Dünyada doğal kaynaklar zamanla azalmaktadır. Mikroorganizmalar bir çok alanda potansiyel üretim için kullanılmaya başlanmıştır. Mikroorganizmalar içinde funguslar önemli bir yere sahiptir. Doğadaki organik maddeleri parçalayarak organik asit, enzim, protein, vitamin ve antibiyotik eldesinde kullanılırlar. Yiyeceklerimizin bozulmasında rol alırlar. İnsan, hayvan ve bitkilerde çoğunlukla hastalıklara neden olmaları fungusların hayatımızda ne kadar öneme sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca ilaç olarak kullandığımız, antibiyotik ve antifungallerin bir kısmı funguslardan elde edilmektedir (12).

Funfuslardan daha çok insan sağlığı üzerinde olumsuz etkiye neden olan çalışmamızda kullandığımız *Saccharomyces cerevisiae*, daha çok ekmek maya endüstrisinde kullanılmaktadır. Bira mayası olarak da bilinmektedir. Vitamin ve hayvansal yem olarak kullanıldığı gibi geri dönüşümü de kolaydır (13).

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*'nin Sistematikteki Yeri

Çalışmamızda kullandığımız *Sacchoramyces cerevisiae* bir fungus türüdür. Bu türe ait sistematik bilgisi Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. *Saccharomyces cerevisiae* canlı sınıflandırmasındaki yeri

Kategori	Takson
Alem (Regnum)	Fungi
Alt alem	Dikarya
Şube (Division)	Ascomycota
Alt şube	Saccharomycotinia
Sınıf (Classis)	Saccharomycetes
Alt sınıf	Saccharomycetidae
Takım (Ordo)	Saccharomycetales
Familya	Saccharomycetaceae
Genus	<i>Saccharomyces</i>
Tür (Species)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen, 1883

Yukarıda verilen sınıflandırma bilgileri aşağıda belirtilen internet sitesinden alınmıştır.

<https://www.itis.gov/servlet/singleRpt/SingleRpt?searc%20topic=TSN&search%20value=194157#null>

2.2.1. Fungi (alem)

Mikolojinin öncüleri, mantarları ortak özelliklere sahip guruplar halinde organize etmeye çalıştılar ve bu morfolojik yaklaşım, ascomycet ve basidiomycet'lerin ayrıştırılmasında ve alt-taksonların belirlenmesinde başarılı oldu. Bununla birlikte, bazı durumlarda spor rengi gibi morfolojik özellikler kullanılarak yapılan sınıflandırmalar, evrimsel akrabalığı olmayan guruplarla bir arada gösterildi. Mantarların filogenetik sınıflandırması, yirminci yüzyılda mikroskopi ve biyokimyada ilerlemeler kaydetti, ancak 1980'lerde polimeraz zincir reaksiyonu ve diğer moleküler genetik tekniklerinin ortaya çıkması, mantar taksonomisi çalışmasını önemli ölçüde değiştirdi. O zamandan günümüze değin geleneksel olarak kabul gören gurupların birçoğu sınıflandırma açısından yeniden düzenlendi ve yeniden adlandırıldı. Mantar sınıflandırmasındaki değişiklikler hala devam etmektedir (14).

Mantarların mevcut taksonomik düzenlenmesinde altı filum (şube) yer almaktadır. Bunlar sırasıyla Basidiomycota, Ascomycota, Glomeromycota, Blastocladiomycota Chytridiomycota ve Neocallimastigomycota'dır.

Mantar sınıflandırmasında Dikarya, Basidiomycota ve Ascomycota'dan oluşan bir alt-alem olarak önerilmiştir. Bu ad, bu mantarda eşeyli üreme sürecinde iki çekirdek içeren hücrelerin oluşumu ifade eder. Genetik veriler, bazı mantarların altı filumun hiçbirine tam olarak uymadığını, ancak ek filumları tanımlamak için yeterli bilgiye sahip olmadığımızı göstermektedir. Tam olarak tanımlanmamış guruplar, basit bir üreme döngüsü gösteren ve çok iyi tanınan *Mucor mucedo* dahi olmak üzere 900 veya

daha fazla zigomycet türünü içerir. Yukarıda listelenen filumlara ek olarak, birçok taksonomistin Fungi aleminin bir parçası olarak gördüğü 1000'den fazla mikro parazit türü vardır (14)

2.2.2. Ascomycota (şube)

Ascomycota, 33.000'den fazla türü ve çok sayıda tanımlanmamış mantarı kapsayan en büyük mantar filumudur. Bu şube, mayaları, filamentöz mantarları, liken simbiyozları oluşturmak için yosun ve siyano bakterilerle ortaklık yapan mantarları, mikorhizal türleri, saprotrofları, bitki ve hayvanların patojenlerini içerir. Bu takson endüstriyel uygulamalarda, gıda üretiminde ve lezzetlendirmede kullanılmaktadır. Birçok tür sadece conidiofor adı verile saplarda aseksüel sporlar üreten aseksüel mantarlar olarak bilinir, ancak ayrıntılı olarak incelenen çoğu türün yaşam döngülerinde eşeysel üreme evreleri tanımlanmıştır (14).

2.2.3. Saccharomycotina (alt-şube)

Bu guruptaki mantarlar tomurcuklanan maya hücreleri üretirler. Morfolojik çeşitlilik sınırlıdır, ancak kısa tomurcuk üreten filamentlerden oluşan psöдохifler belirli koşullar altında oluşur ve türlerin bazıları uçta büyüyen hifler ve uzamış asci üretirler. Bu taksona bağlı olan *Saccharomyces cerevisiae* olgunlaşmış meyvelerde bulunan şeker açısından zengin diyet ile gelişir. Düşük oksijen mevcudiyeti koşullarında glikozu metabolize etme ve karbondioksit ve alkol üretme kabiliyeti, insanların binlerce yıl bira üretmesini, sağlamıştır. Maya hücresi tomurcuklanarak bir haploid hücre olarak çoğalır. Tek çekirdek mitozla bölündüğünde, yavru çekirdeklerinden biri tomurcuk içine kaydırılır. Tek bir hücre bir dizi tomurcuk üretebilir ve her biri ayrıldıktan sonra ana hücrenin yüzeyinde bir iz bırakır(14)

2.2.4. *Saccharomyces cerevisia*

Mantarlar âleminde bulunana tek hücreli, tomurcuklanma ile üreyen ve ökaryotik bir canlıdır. *S. cerevisiae* genomu 24 Nisan 1996 da tam olarak sekanslanan ilk öyaryot canlıdır. Avrupa, Kuzey Amerika ve Japonya'da 600 den fazla bilim adamı tarafından 100 labarotuvarda *S. cerevisiae*'nın sekanslaması yapıldı. *Saccharomyces* Genome Database bu çalışmanın üzerine kurulmuş bir bankadır. SGD ökaryotik hücre genetiği, fizyolojisi ve organizasyonu hakkında temel bilgilerin geliştirilmesinde önemli bir yere

sahiptir. Dizilenen genom ve gelişen moleküler biyoloji teknikleri ile birlikte uluslararası ortak çalışmalar maya biyolojisinde büyük gelişmelere neden olmuştur (15).

S. cerevisiae büyüklüğü 200 ile 2.200 kb arasında değişen 16 kromozomdan oluşur. Genomu yaklaşık olarak 13.392 kb dır (16).

S. cerevisiae, sitoplazmada bulunan mitokondriyal DNA, viral DNA, dairesel plazmit DNA ve nükleer DNA olmak üzere birbirinde bağımsız dört farklı genetik materyale sahiptir (15). *S. cerevisiae*'nın genetik özellikleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. *S. cerevisiae*'nın genetik özellikleri

Özellik	Miktar
Genom Büyüklüğü:	12.5 Mb + rDNA (rDNA genellikle 1-2 Mb, oldukça değişken)
Tek Kopya:	12,0 Mb
Genetik harita uzunluğu:	>4300 cm
Kromozom sayısı :	16
Organel DNA'sı (Mitokondriyal DNA):	75 kb
Ekstrakromozomal elementler:	2- mikron plazmiti DNA'sı Çift zincirli RNA virüsleri

S. cerevisiae'nın XII. Kromozomu en büyük kromozomdur. XII. Kromozomun büyüklüğü 100-200 kopya aralığında değişen rDNA tekrarları nedeni ile 2060-3060 kb arasındadır (Çizelge2.3) (15,17).

Tablo 2.3. *S. cerevisiae*'nin kromozom uzunlukları (17).

Kromozom No	Kromozom uzunluğu (Kbç)
I	240
VI	280
III	350
IX	440
V	590
VIII	590
XI	680
X	755
XIV	810
Kromozom No	Kromozom uzunluğu(Kbç)
II	840
XIII	950
XVI	980
VII	1.120
XV	1.130
IV	1.640
XII	1.095 + rDNA
Toplam	12.490 + rDNA

*Sıralama kromozom uzunluklarına göre yapılmıştır. rDNA kopya sayıları *S. cerevisiae* suşuna göre değişkenlik gösterebilmektedir (15,17).

2.3. Antifungaller

2.3.1. Polienler-Griseofulvin (amfoterisin b ve türevleri)

Polienler mantarların sterol halkasına bağlanıp hücrenin membran özelliğini bozarak etkisini gösterirler. Amfoterisin B Nistatin bu grupta yer alır (18).

Amfoterin B mantarların hücre duvarındaki ergosterol gibi sterollere bağlanıp delikler oluşturarak hücre zarı geçirgenliğini artırıp intraselüler potasyum, şeker, magnezyum ve metabolitlerin hücre dışına çıkışı ile mantarın ölümüne neden olur (18).

Amfoterisin B *Candida* türlerine, *Aspergillus* türlerine, Mucorales takımına, fırsatçı mikoz ve endemik mikozlara karşı etkinliği bilinen geniş spektrumlu fungisidal bir antifungaldir (19).

Amfoterisin B, *Streptomyces nodosus*'dan elde edilen ve paranteral infüzyon ile uygulanan bir antifungal antibiyotiktir. Nistatine benzer polien sınıfında yer alır fakat imidazol yapılı değildir. Amfoterisin B yan etkileri, toksisitesi bilinmesine rağmen ve

imidazol sınıfı yeni ilaçlarına bulunmasına rağmen çoğu sistemik mantar enfeksiyonların tedavisinde ilk sırada yer almaktadır. Amfoterisin B nadir olarak bağırsak sterilizasyonu için ağız yolunda kullanılmaktadır. Gastrointestinal kanaldan çok az abrorbe olduğu için enfeksiyonların tedavisinde parental yoldan verilmektedir. Amfoterisin B 30 mg intravenöz yoldan verildiğinde birkaç saat sonra serum doruk konsantrasyonu 1 µg/mL'dir. Aynı zaman diliminde içinde 50 mg'lık doz verildiğinde serum doruk konsantrasyonu 2 µg/ml olmaktadır. Amfoterisin B intramüsküler yoldan verilmez.

Amfoterisin B çok kompartımanlı bir dağılım göstermektedir. Gözde aköz hümör, plöralü perikardiyal, peritinoyal sinoviyal sıvılarda düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Santral sinir sisteminde, serumda bulunan konsantrasyonunun %3'ü kadardır. Dolayısı ile Santral sinir Sistemi enfeksiyonların tedavisinde fungustatik amforerisin B'nin intratekal verilmesi gerekmektedir. Araknoid villuslar amfoterisin B'yi SSS uzaklaştırır ve ilaç beynin ekstraselüler kompartımanlarında depolanarak bir rezarvuvar görevi görür. Amfoterisin B önce lipoproteinler olmak üzere %90-95 oranında proteinlere bağlanır. İlacın çok az bir kısmı safra yolu ile atılmaktadır. Yaklaşık % 2-5 renal çok yavaş elimine olur; ilacın % 40 vücuttan 7 günden fazla bir sürede atılmaktadır. Böbrek fonksiyonları normal yetişkinlerde plazma eliminasyon yarı ömrü 24 saattir. Amfoterisin B tedavi kesildikten sonra kanda 4 hafta ve 4-8 hafta idrarda saptanabilmektedir (20).

Amfoterisin B'ye karşı gelişen direnç nadirdir. İlaça duyarlı mantarlar *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *C. albicans*, *C. guilliermondi*, *C. tropicalis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* (21).

Nistatin: Dört çift bantlı polien antifungal bir antibiyotiktir. *Candida* türleri üzerine çok etkili bir antifungaldir. Fungisidal ve fungisitik etkisi bulunmaktadır. Krem ve pomat gibi topikal formlarının yanı sıra oral formu da bulunmaktadır (22).

2.3.2. Alilamin türevleri (naftidin, terbinafin)

Skualen epoksidazı seçici olarak engeller, ergosterol sentezini erken basamakta bloke etmektedir. Ayrıca inhibisyon sonucu hücre içinde fazla biriken skualen nedeni ile mantarın hücre duvarının sentezini ve fonksiyonunu bozarlar (23).

Terbinafin oral veya tropikal olarak kullanılan bir antifungaldır. Farmakolojik olarak naftidine benzemektedir. Oral yoldan kullanılabilen terbinafin, fungusit aktivitesi ve tırnakta konsantre olma yeteneği nedeni ile onimikoz tedavisinde yüksek derecede etkinliğe sahiptir. Onikomikoz tedavisinde griseofulvin ve intrakonazole üstünlüğü kanıtlanmıştır (21).

2.3.3. Ekinokandinler

Ekinokandinler, geniş spektrumlu lipopeptit yapılı bileşiklerdir. Diğer antifungallerden farkı mantarların hücre duvarında 1,3-beta-D- gulukan sentezini inhibe etmesidir. 1,3 -beta-D- gulukan sadece mantar hücrelerinde bulunduğundan sadece mantar hücrelerine toksiktir. Memelilerin hücrelerine zarar vermemesi, kullanılmasında özel tercih sebebidir (24).

Ekinokandinler hücre duvar sentezini inhibe ederek *Candida* ve *Saccharomyces* türlerinde fungisidal etki göstermesine rağmen, *Aspergillus* türlerinde fungustatik etki gösterir. Bu durumun mantarın hücre duvar yapısında değişen oranlarda gulukan bulunmasından kaynaklanmaktadır (25).

Klinikte kullanılabilen olan üç antifungal bulunmaktadır. Bunlar kaspofungin, mikafungin, anidulafungin preparatlarıdır (18).

Kaspofungin invaziv kandida enfeksiyonlarında, lipozomal Amfoterisin B ve varikanozole dirençli aspergilloz tedavisinde kullanılır. Mikafungin, *Candida* enfeksiyonların tedavisinde kullanılırken allojenik kemikiliği nakli yapılan hastalarda profilaksi amaçlı kullanılmaktadır. Anidulafungin kandidiyazis ve kandida özefajit tedavisinde kullanılmaktadır. Ekinokandinler böbreğe ve karaciğere toksik değildir (25).

Ekinokandinlere karşı gelişen direnç tüm mantarlarda aydınlatılamadığından bu gulukan sentataz enziminin FKS subunitiyle bağlantılandırılmıştır (26).

2.3.4. Pirimidinler (Nüklezid Analoğu) 5Fulisitozin

Nükleik asit sentezini inhibe edip pirimidin metabolizmasını bozarak mantar hücreindeki DNA, RNA ve protein sentezini engelleyerek antifungal etki neden olurlar. *Aspergillus* enfeksiyonlarında kullanılan bir antifungaldır (18).

2.3.5. Azoller

Azol gurubu antifungaller kimyasal formülünde azol halkası bulunduran bileşiklerdir. Azoller genel anlamda fungustatik etki gösterirler. Ancak bazı triazoller bazı mantarlara karşı fungusidal etki gösterirler. Buna en güzel örnek varikonazolün *Aspergillus*'a karşı fungusidal etkisidir.

Azol halkasındaki nitrojen sayılarına göre imidazoller ve triazoller diye iki ayrılır. Ketokonazol, mikonazol ve klotrimazol gibi imidazoller iki nitrojen bulundurur. İtrakonazol, flukonazol, vorikonazol, posakonazol, isavukonazol ve ravukonazol gibi triazoller üç nitrojen bulundurur. Azoller sitokrom p-450 bağımlı 14- α demetilaz enzimini inhibe ederler. Bu durumda ergosterolden lanestrol sentezi engellenmiş olur ve hücre membranı sentezlenemez (27).

Triazoller memeli hücre membranından çok mantar hücresine etki etmesiyle imidazollerden daha güvenilirdir. İmidazoller sadece yüzeysel mantar enfeksiyonlarında kullanılırken, triazoller hem yüzeysel enfeksiyonlarda hem de invaziv mantar enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (28). Flukonazol *Candida* enfeksiyonlarında en sık kullanılan ilaçtır. Aynı zamanda transplant hastaları kriptokok menejit geçirmiş immün yetmezlik sendromu (AIDS) hastalarında profilaksi amacı ile kullanılır. *C. krusei* flukonazole doğal direnç kazanmıştır (28).

Azoller ilk olarak 1944'te Wooleyn tarafından sentezlenmiştir. İmidazol olan ketokonazol 1981'de, flukonazol 1990'da, itrakonazol 1992'de, vorikonazol 2002'de ve posakonazol triazol bileşikler 2006'da FDA onayı alarak uygulama alanına girmiştir (29).

Azoller, özellikle *Aspergillus* enfeksiyonlarının tedavisinde oral kullanılması, etkinliğinin iyi olması, tolere edilebilirliği ve nispeten düşük toksik etkileri nedeniyle tercih edilmektedir. Azol direnci 1990'lı yılların sonunda *Aspergillus fumigatus* izolatlarında görülmüştür. Azol direncinin oluşmasıyla ilgili iki ihtimal düşünülmektedir. Birincisi tarımda fungusit olarak azollerin kullanılması ikincisi de kliniklerde yoğun olarak azollerin kullanılmasıdır (30,31).

Azol gurubu antifungallere karşı gelişen direnç, doğal direnç ve kazanılmış direnç olmak üzere ikiye ayrılır. Doğal direnç, bir tür veya kökenin kalıtım ile gelen özelliğidir. Kazanılmış direnç ise uzun süre antifungal kullanan bireylerde duyarlı olan

bir izolatin direnç kazanmasıdır. Kazanılmış azol direnci 1990'lı yıllarda HIV'lı hastalardan izole edilen *C. albicans* türlerinde görülmüştür. Kazanılmış azol direncinin bilinen bazı mekanizmaları gen mutasyonları, genin ekspresyonundaki artış, atım pompalarının aktivasyonunda artış ve membran geçirgenliğindeki azalmadır (31,32).

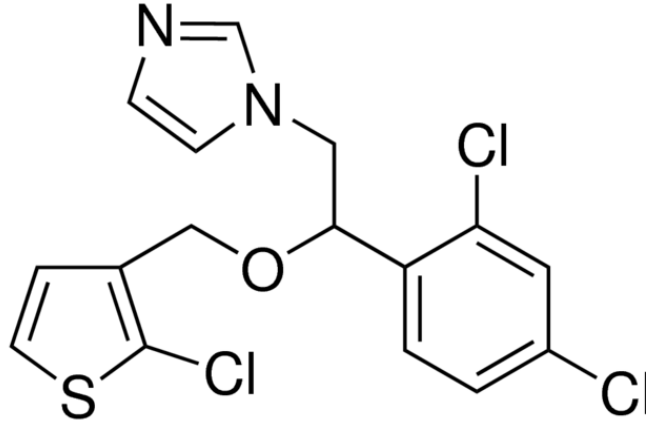
2.3.6.Triazoller

2.3.7.Tioconazole

Tioconazole tropikal olarak kullanılan geniş spekturumlu sentetik imidazol yapılı antifungal bir ilaçtır. Dermatofit, maya, ve diğer mantarlara karşı fungusid etkilidir. Ayrıca stafilokok ve streptokok türleri birçok gram-pozitif mikroorganizmaya karşı antibakteriyel aktivitesi de vardır. Topikal olarak dermal kandidiyazis, onikomikoz ve vulvovajinal kandidiyazis tedavisinde kullanılır.

Tioconazole etkisini mantar hücresinin membran geçirgenliğini bozarak etkisini gösterir. Ergosterol fungusun hücre membranındaki temel bileşenlerini oluşturur. Tiokonazole, lanosterol'ün ergosterol'e dönüşümünde sorumlu bir sitokrom P-450 enzimi olan 14- α demetilaz ile etkileşerek ergosterol sentezini önlemektedir. Tioconazole in vitro olarak: *Candida* species (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis* ve *C. tropicalis*) karşı etkilidir. Özellikle *Corneobakterium minutissimum* ve *Bacteroides* bakterilerine karşıda etkilidir.

Tiokonazole beyaz ve kırılmalık halde bulunur. Suda çok az çözünür, metanol, etanol ve kloroformda çözünür. Kapalı formülü C₁₆H₁₃Cl₃N₂O₅ RX Media Pharma 2019



Şekil 2.1. Tioconazolenin kimyasal formülü (Sigma-Aldrich).

İmidazol türü çeşitli antifungaller 1978 yılından beri kullanılmaktadır. Cilt ve mukozaların mantar enfeksiyonu ile kronik mukakütonöz kandidiyazis tedavisinde diğer ilaçlara üstünlük gösterirler. Sistemik kullanılanların çoğu anfoterisin B'den daha etkili değildir fakat anfoterisin B'den daha az toksik etkiye sahiptir. Tioconazole dermatofitlere karşı sadece lokal olarak kullanılmaktadır. Lokal olarak kullanılan azol türevi antifungallerin etkinlikleri ve yan etkileri yönünden birbirine benzemektedirler. Uygulandıkları cilt bölgelerine yavaş ve düşük derecede absorbe olurlar (33). Tioconazole dermatofitler, *Malessezia furfur* ve *Candida albicans*'lara karşı antifungal etki gösteren geniş spektrumlu imidazol türevi ilaçtır. *Candida albicans*'ları tedavide klinikte kullanılan beş imidazol (Klotrimazol, ekonazol, ketokonazol, mikonazol ve tioconazol) karşılaştırıldığında tioconazolenin diğerlerine üstünlük sağladığı görülmüştür (34). Günümüzde tinea enfeksiyonlarının, *Pityriasis versicolor* ve candidiasislerin tedavisinde kullanılır. %1'lik krem, %6,5 vajinal merhem losyon, pudra, 100mg vajinal tablet formu ile %28'lik tırnak solüsyonu mevcuttur (33).

Triazoller: İtrakonazol- Vorikonazol- Posakkonazol- Ravukonazol- Flukonazol- Alilaminlerdir.

2.4. Mantar Enfeksiyonlarında Tanı

2.4.1. Mikroskobi

İnsanlarda hastalığa neden olan mantarlar *Candida*'lardır. *Candida*' lar tek hücreli olup klinik numunelerde ve kültürde mikroskopik olarak 4-6 mikrometre çapında gram pozitif olarak boyanan yuvarlak veya oval görülürler. Özellikle antimikrobiyal kullanıma bağlı ileri derecede polimorfizm gösterirler (35).

Aspergillus fumigatus kolonileri besiyerinde mavi ve ya yeşil renkte, kadifemsi koloniler oluşturur. Mikroskopik olarak küresel olmayan çomak benzeri veziküllere sahiptir. Veziküllerin üst yarısı veya üçte ikilik kısmı tek sıra uzanan fiyalit yapılar görülmektedir. *Aspergillus flavus* kolonileri sarı-yeşil renkte granüler yünsü şekilde ürer. Mikroskopik değerlendirmede fiyalitler vezikülün tamamını kaplamış ve konidyumlar fiyalitlerin etrafında papatya gibi görünür.

Mikroskopik inceleme kültürde üreyen etkenin doğrulanması ve hızlı sonuç alınması açısından önemlidir. Bu doğrultuda laboratuvarında gram boyama, histopatolojik incelemelerde Periyodik Asit-Schiff (PAS) ve Gomori metemin gümüş boyası kullanılır. Direkt mikroskopik inceleme hızlı sonuç verir ve ekonomiktir. Dezavantajları teknik donanım gerektirmesi değerlendirenin bilgi ve deneyimine bağlı olması sonucu etkilemektedir (31).

2.4.2. Kültür

Candida'lar, 35 °C'de aerob ortamda mikrobiyolojide kullanılan genel üretim besiyeri ya da mantarlar için seçici besiyeri olan (pH 5,6) Sabouraud dekstroza agar (SDA)'dır. Kolonilerin oluşması ve belirginleşmesi 24-48 saat sürmektedir. Besiyerlerin içine çeşitli antibiyotikler konularak bakterilerin üremesi engellenir. *Candida*'lar kültürde kirli beyaz krem renkli, yumuşak kıvamlı maya kokan ve düzgün yüzeyli kolonilerdir. İnkübasyonun uzamasına bağlı yüzeyi kıvrımlı mat veya parlak koloniler oluşur (36).

Bütün mantar enfeksiyonlarında olduğu gibi, klinik materyalden *Aspergillus* türlerinin izolasyonu ve değerlendirilmesi zordur. Kültür sonuçlarının direkt mikroskopi sonuçları ile değerlendirilmesi daha doğru olur. *Aspergillus*'un kültürde üremesi aynı zamanda direkt mikroskopide *Aspergillus* ile uyumlu hiflerin bulunması enfeksiyon için önemli bir bulgudur. *Aspergillus*'ların çoğu sikloheksimid içermeyen rutin mikolojik

besiyerlerinde ürer ancak tür düzeyinde tanımlama SAD'de üretilen mantarların makroskopik ve mikroskopik incelenmesine dayanır (31).

Kültür duyarlılığının düşük olması, geç sonuç vermesi ve kültür için örnek alınması çoğu zaman girişimsel işlem gerektirmesi sonucu kültür dışı tanı testlerine yönelime neden olmuştur.

2.4.3. Serolojik yöntemler

Candida'ların tanısında hasta serumunda *Candida*'ların antijenik yapıları, bu antijenler karşı oluşan antikorlar ve metabolitleri aranır. Antikor taramasında mannan, enolaz ve intrastoplazmik antijenlere karşı oluşan antikorlardan yararlanılır. Kullanılan antijenlere bağlı testin özgünlüğünde duyarlılığında farklı sonuçlar elde edilmesi ve ümmün yetmezlik hastalarında yanlış negatiflik, kolonizasyona bağlı yanlış pozitiflik vermesi nedeni ile duyarlılık ve özgünlükleri azdır.

2.4.4. Galaktoman atijen testi

Mantar antijenlerinin ve metabolitlerin aranması tanı için serolojide daha önemlidir. Bunun için ısıya duyarlı antijen, mannan, D-arabinitol ve enolaz araştırılır. En yaygın kullanılan mannan antijen testidir. Mannan, *Candida* hücre yüzeyinin enfeksiyon sırasında dolaşıma geçen karbonhidrattır (36).

Özellikle invaziv aspergilloz tanısında serumda galaktomannan antijeninin bulunması çok önemlidir. *Aspergillus* türlerinin hücre duvar polisakariti olan galaktomannan (GM), immüjenik yapıya sahiptir. Dokuda mantarın çoğalması sırasında kana geçer. Kandaki değeri 0.5-1 ng/ml ulaştığında ELISA yöntemiyle tespit edilebilmektedir. Serumda ve bronkoalveolar lavaj sıvısında GM antijen testine bakılır. Klinikte invaziv aspergilloz belirti ve bulguları ortaya çıkmadan GM antijeni tespit edilmesine rağmen bazı yetersiz kaldığı durumlar vardır. Antifungal tedavi alan hastalarda duyarlılığı azalmaktadır. Piperasilin-tazobaktom antibiyotiği ile çapraz reaksiyona girmekte hatta ilaç kesilmesine rağmen 5 gün serumda GM antijeni tespit edilmektedir. Hematopoetik kök hücre nakli yapılan hastalarda 100 gün içinde, kemoterapiye bağlı gastrointestinal mukozit ve GVHD (Graft versus host disease) gelişen hastalarda yanlış pozitiflik gözlenmektedir. Kan ürünü ve intravenöz ümminglobülün alan hastalarda yanlış pozitif sonuçlar vermektedir. Yanlış pozitiflikleri ekarte etmek için art arda iki defa GM antijeni bakılmalıdır (31).

2.4.5. 1-3-Beta-D- Glukan testi

1-3 beta-D glukan (BG) antijeni *Zigomicetes* ve *Cryptococcus* türleri dışındaki tüm mantarların hücre duvarında bulunmaktadır. Glukan birçok patojen mantarın hücre duvar bileşenidir. (1-3) beta- D-glukan serumda düşük düzeylerde bile saptanabilmektedir. Serumdaki düzeyleri antifungal tedaviden etkilenmemektedir. Geniş spektrumlu bir testtir. *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Scedosporium* ve *Pneumocystis jirovecii* tarafından meydana gelen invaziv mantar enfeksiyonlarında tespit edilebilmektedir, ancak pozitif sonuçlar radyolojik ve mikrobiyolojik yöntemler ile desteklenmelidir (37).

2.4.6. Moleküler yöntemler

“Geçen yüzyılda mikroorganizmaların tanımlamasında biyokimyasal ve fenotipik yöntemler kullanılırken, moleküler yöntemlerin kullanılması son yıllarda artış göstermiştir. *Candida* türlerinin tanımlanmasında hızlı olması, hassas ve özgüllüğün yüksek olması bunda etkili olmuştur. *Candida*’ ların tanımlanmasında prob tabanlı veya amplifikasyon tabanlı birçok teknik geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin amacı, moleküler hedef kullanılarak genomdaki genetik bölgenin bulunmasıdır. Polimeraz zincir reaksiyonu ve diğer amplifikasyon yöntemleri, klinik örneklerde küçük miktardaki hedef DNA’yı belirlemeye izin verir. Prob tabanlı yöntemlerden biri olan Peptide Acid Fluorescence in situ Hybridization (PNA-FISH) yöntemi ile kültür sonrasında florasanla işaretlenmiş oligonükleotid probalar kullanılarak *Candida*’ ların tanımlaması yapılabilmektedir. *Candida* PNA-FISH, yüksek oranda duyarlılık ve özgünlük gösterir”(36).

Yaygın aspergillozlu hastalarda yüksek mortalite, serolojik testlerdeki sınırlılık, antifungal tedavinin kültür ve serolojik testlerde negatifliklere yol açması nedeni ile araştırmalar PCR üzerine yoğunlaşmıştır. PCR gibi DNA varlığını saptayan yöntemlerde çelişkili sonuçlar tespit etmişlerdir. Bazı çalışmalarda antijen testlerine göre üstün performans gösterse de diğerlerinde tam tersi sonuçlar elde edilmiştir. PCR erken tanı için değerli olmasına rağmen hiçbir moleküler test, EORT/MSG invaziv fungal enfeksiyon tanı kriterleri arasında yer alamamıştır. Bunun sebebi standartlaşmış yöntemin bulunmamasıdır (31).

2.5. Antifungal Duyarlılık Testleri

Son yıllarda immün sistemi baskılanmış hastaların sayısında belirgin bir artış olmuştur, bu artış doğal olarak farklı direnç mekanizmalarını karşımıza çıkarmıştır. Bu durum mantar enfeksiyonlarının doğru tedavisi için antifungal duyarlılık testlerini zorunluluk haline getirmiştir. Antifungal duyarlılık testleri belirli standartlar dikkate alınarak yapılmaktadır. Bütün laboratuvarlar Klinik Laboratuvarlar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standart Institute, CLSI) veya Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) tarafında küfler ve mayalar için geliştirilen standartlara uygun antifungal duyarlılık testleri çalışılıp rapor edilmektedir. Maya mantarları için CLSI M27-A3 (sıvı mikrodilüsyon), CLSI M44-A2 (Disk difüzyon), ve EUCAST E.Def 7.3.1 (sıvı mikrodilüsyon) kılavuzlarını kullanmaktadır. Küf mantarları için CLSI M38-A2 (sıvı mikrodilüsyon), EUCAST E.DEF9.3.1 (sıvı mikrodilüsyon) CLSI M51-A (disk difüzyon) kılavuzları kullanılır. Referans yöntem sıvı mikrodilüsyon yöntemidir (31).

2.5.1. Sıvı dilüsyon testi

Sıvı dilüsyon testi makrodilüsyon ve mikrodilüsyon olarak ikiye ayrılır. Makrodilüsyonda izole edilen mikroorganizma, ilacın iki kat sulandırımını içeren bir dizi tüpe ekim yapılır. Sonuçlar görsel olarak değerlendirilip, üremenin olmadığı ilk tüp minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak kabul edilir. MİK olarak belirlenen tüp ve takip eden tüplerden agar plaklara ekim yapılarak minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) da elde edilir. Çok sayıda antifungal duyarlılık testi çalışan merkezlerde daha pratik olması ve sarf malzemenin az olduğu 96 kuyucuklu mikropalakalarda sıvı mikrodilüsyon testi çalışılmaktadır. Küf mantarları için; EUCAST E.Def 9.2'yi önerirken CLSI, M38-A2 kılavuzlarını önermektedir. Duyarlılık testlerinde makrodilüsyon yönteminin maliyetinin yüksek olması, zaman alması ve uygulamasının zorluğu nedeni ile sıvı dilüsyon testi önerilmektedir, yöntemler arasındaki bazı farklar: EUCAST düz tabanlı mikropalaka, CLSI U tabanlı mikropalaka önermektedir. Sıvı besiyerlerinde CLSI RPMI 1640 besiyerini önerilirken, EUCAST'te bu besiyerine %2'lik glukoz ilavesi gerekmektedir. İnokulum miktarları, CLSI'te 0.4-5x10000 hücre/mL, EUCAST 1-2.5x100000 hücre/mL önerilmektedir. İnokulum süreleri, CLSI

48 saat ve EUCAST'te 24-48 saat bu farklara rağmen *Candida* ve *Aspergillus* türleri için uyum oranları sırası ile %90-99, %99-100'dür (38).

2.5.2. Gradient test

“Azalan dilüsyonlarda antifungal ajan emdirilmiş kağıt ve ya plastik striplerin, test edilen mikroorganizma besiyerine yayıldıktan sonra agar üzerine yerleştirilmesi esasına dayanan bir testtir. Sonuçlar genellikle 24-48 sonra değerlendirilir. Üreme inhibisyon zonu ile antifungal emdirilmiş kağıdın kesişim noktasındaki değer MİK olarak kabul edilir” (31).

2.5.3. Disk difüzyon test

CLSI'nın geliştirdiği referans disk difüzyon yöntemi agar bazlı bir yöntemdir. Besiyerinde %2 dekstroz ve 0.5 µL/mL metilen mavisi eklenmiş MullerHinton agar bulunur. Bu yöntemde, flukonazol ve varikonazol için değerleri tanımlanmış 24 saatlik inkübasyon sonrasında zon çapları ölçülerek değerlendirilir. Agar disk difüzyon testi, sıvı dilüsyon testinin uygulaması kolay ve maliyeti düşük olan alternatifidir (38)

3. MATERYAL VE METOT

Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan cihazlar

CİHAZ	FİRMA
Etüv	Nüve EN 120
Otoklav	Nüve OT 40L
Çalkalamalı inkübatör	Daihan Scientific
Vortex	DLAB MX-S Wisd VM-10
Aspiratör	OPTIC ivymen® SYTEM
Çok amaçlı santrifüj	Nüve NF 800R
Spektrofotometre	Denovix DS-11 FX+
Su banyosu	Nüve NB 20
Distile su cihazı	Direct-Q® 5UV
Otomotik pipet seti	Thermo Scientific
Görüntüleme sistemi	SYNGENE G:BOX Chemi XR5
Masaüstü mikrosantrifüj	SIGMA 1-14
Blok ısıtıcı	Thermo Scientific
Hassas terazi	OHAUS® PIONEER®
Terazi	OHAUS®

Tablo 3.2. Deneylerde kullanılan kimyasallar

KİMYASALLAR	FİRMA
Tiokonazol (TIO)	Sigma
Maya özütü	Panreac applichem
Glikoz/Dekstroz	Difco
Pepton	Panreac applichem
Tris-HCl	Sigma
EDTA	Sigma
Lityum asetat	Sigma
PEG	Panreac applichem
Bakto agar	Difco
L-metiyonin	Panreac applichem
Urasil	Panreac applichem
L-histidin	Panreac applichem
L-lösin	Panreac applichem
DMSO	Panreac applichem
Tripton	Panreac applichem
NaCl	Panreac applichem
litikaz (5 U/mL)	Sigma
MgCl ₂	Panreac applichem
MgSO ₄	Panreac applichem
YNB (Maya Azotlu Bazları)	Difco
CaCl ₂	Panreac applichem

3.1. İlaç, Maya Suşu, Hücre Büyümesi ve gDNA Kütüphane Taraması

Kütüphane taraması, direnç ve duyarlılık testlerinde üretici firma tarafından liyofilize halde tedarik edilen Tiokonazol (TIO) (Sigma) kullanıldı. Maya Suşu olarak, bu çalışmamızda BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*; EUROSCARF) suşu ve BY4743 (*MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0*; EUROSCARF) suşu ve bu suşun izogenik delesyon mutantları kullanıldı. Kütüphane taraması için ise yüksek kopya maya genomik DNA kütüphanesi

(ATCC No.37323) kullanıldı. Maya transformasyonları için standart LiAc metodu aşağıda gibi uygulanarak transformant maya hücreleri elde edildi;

1. Maya hücreleri OD600 = 0.5-0.7'ye kadar 37 °C'de 10 ml YPD ortamında [% 2 pepton %, 1 maya özü (Panreac applichem) ve % 2 glikoz / dekstroz, (Difco)] kültüre edildi ve ardından 5 dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüj edildi.
2. Hücreler, 1 mL 1X LiOAc-TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.1 M Lityum asetat pH 7.5, Sigma) çözeltisi ile yıkandı ve süpernatant, 5 dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüj işleminden sonra uzaklaştırıldı.
3. Hücreler 100 µl 1X LiOAc-TE çözeltisi içinde yeniden süspanse edildi ve 30 °C'de 1 saat çalkalandı.
4. 100 µl hücre, 2 µL maya genomik DNA kütüphanesi (multicopy YEp13 plazmid) ve 5 µL ssDNA karıştırıldı ve 30 ° C'de 30 dakika inkübe edildi.
5. 700 µL PEG karışımı (% 40 PEG (Panreac applichem), 1X TE ve 1X LiOAc, Sigma) ilave edildi ve iyice karıştırıldıktan sonra 30 °C'de 1 saat inkübe edildi.
6. Daha sonra hücre çözeltisine, 42 °C'de su banyosunda 15 dakika süreyle ısı şoku uygulandı.
7. PEG'yi uzaklaştırmak için 4000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi, tüm PEG izlerini uzaklaştırmak için tekrarlandı.
8. Hücre peleti 100 µL su ile yeniden süspansiyon haline getirildi ve farklı ilaç konsantrasyonlarını içeren seçici YNB agar (leu-) (% 0.67 YNB,% 2 glikoz ve % 2 bakto agar, Difco) plakaları üzerine yayıldı.
9. 30 °C'de 72 saat süreyle inkübe edildi ve daha sonraki çalışmalar için + 4 °C'de saklandı.
10. Yabanıl tip (Wild type) ve delesyon mutantları YPD zengin medya (% 1 Maya Özü,% 2 Pepton,% 2 Dekstroz) ortamında ve transformantlar ise YNB seçici besiyeri ortamında kültüre edildi.

3.2. MIC (Minimal Inhibitory Concentration) Analizi

MIC analizi, EUCAST BMD testi, maya büyümesi ve tarama koşullarına uyum sağlamak için bazı modifikasyonlarla EDef 7.3.1 belgesinde açıklandığı gibi gerçekleştirildi (39). Kısacası, önce steril suda maya hücre solüsyonu (5×10^6 100 CFU / mL) hazırlandı. BY4741 suşunun oksotrofik gereksinimleri için RPMI ortamı yerine, gerekli amino asitler ve nükleobazlar [L-metiyonin 5 mg, L-lösin 10 mg, L-histidin 5 mg, urasil 1 mg 100^{-1} mL (Panreac applichem)] ilave edilerek YNB (Maya Azotlu Bazları) ortamı (YNB 0.67 g, glikoz 2 g 100^{-1} mL) kullanıldı. Antifungal (Tiokonazol) stok çözeltisi% 100 DMSO içinde hazırlandı ve seri dilüsyonları, düz tabanlı 96 kuyucuklu plakalarda YNB ortamı kullanılarak hazırlandı. Hücre solüsyonu ilave edildikten sonra, antifungal ilacın nihai konsantrasyonları 0.008 ile 8 mg/L arasında oldu. Plakalar 30 °C'de inkübe edildi ve MIC, 24 saatlik inkübasyondan sonra 530 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. MIC değeri kontrol (ilaçsız) hücre grubuna kıyasla büyümede %50 ve daha fazla azalmaya sebep olan en düşük ilaç konsantrasyonu olarak hesaplanmıştır.

3.3. Gradyan Plaka Hazırlama ve Spotlama Analizi

Gradyan plakalar Metzenberg ve Grotelueschen tarafından tarif edildiği gibi hazırlandı (40).

Kısaca, ilaçsız 35 mL YPD agar besiyeri 100 mm x 100 mm kare Petri kaplarına 30°' lik bir açıyla eğilimli olarak döküldü. Agar katılaştığında, ilacın öldürücü dozunu içeren 50 mL' lik aynı besiyeri döküldü ve plaka, bütün agar katılaşana kadar yatay olarak bırakıldı. Spotlama analizleri için, taze hücrelerin süspansiyonları (OD600= 0.2) seri olarak (10'ar kat) seyreltildi ve farklı konsantrasyonlarda ilaç içerecek şekilde hazırlanmış olan YPD agar besiyeri plakalara 5'er µL damlatıldı. Gradyan plakalar için 5 µL OD600 0.2 hücre solüsyonu (rastgele seçilmiş 5 farklı koloniden alınan) aynı hat boyunca tek tek damlatıldı. Plakalar 30 °C' de 3 gün (72 saat) inkübe edildi ve fotoğraflandı.

3.4. Plazmid İzolasyonu ve Gen Klonlama

Maya hücreleri, izolasyondan önce Tris-EDTA (TE) tamponunda 30 dakika boyunca litikaz (5 U/mL) (Sigma) ile sindirildi. Plazmidler, üretici tarafından tarif edildiği gibi GeneJET Plazmid Miniprep kiti (ThermoScientific) kullanılarak maya hücrelerinden izole edildi ve vektöre özgü primerler (Yep13F1: CTTGGAGCCACTATCGACTACG – insert olan yere 27 bp önce bağlanıyor) kullanılarak sekanslandı. İzole edilmiş plazmidler, transformasyona uyumlu hale getirilmiş TOP10 E.coli hücreleri kullanılarak çoğaltıldı.

TOP10 E. coli hücreleri transformasyona uyumlu hale getirilebilmesi için aşağıdaki prosedür uygulandı;

1. TOP10 hücreleri 5 mL sıvı LB [%1 tripton, %0.5 maya özütü ve %1 NaCl (Panreac applichem)] ortamına ekildi ve gece boyunca 37 ° C'de inkübe edildi.
2. LB ortamında büyütülen hücreler, 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra 100 mL SOB ortamına [% 2 tripton ve % 0.5 maya özütü ,% 0.05 NaCl ve% 1 Mg çözeltisi (1 M MgCl₂ artı 1 M MgSO₄) (Panreac applichem)] aktarıldı.
3. Hücreler 2 saat boyunca 37 °C'de çalkalamalı inkübatör ile inkübe edildi.
4. SOB ortamında büyütülen hücreler, ara sıra çalkalanmak kaydıyla 10 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi.
5. Daha sonra hücreler eşit olarak 2 taze falkon tüpüne aktarıldı ve 4000 x g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırıldı.
6. Pelet haline gelen hücreler 5 mL CMG tamponu (50 mM CaCl₂ ve 50 mM MgCl₂, Panreac applichem) ile yeniden süspansiyon haline getirildi ve bu çözelti bir tüpe toplandı.
7. Buz üzerinde 5 dakika inkübasyondan sonra, 4000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
8. Pelet haline gelen hücreler tekrar 5 mL CMG tamponu içinde yeniden süspanse edildi ve buz üzerinde 5 dakika inkübe edildi.
9. Daha sonra 150 µL DMSO (Panreac applichem) ilave edildi ve 5 dakika buz üzerinde inkübe edildi.

10.İnkübasyondan sonra 150 µL DMSO ilave edildi ve ters-düz çevrilerek karıştırıldı.

11.Son olarak, her bir eppendorf tüpüne 100 µL transformasyona uyumlu hücre çözeltisi alındı ve -80 °C' de saklandı.

S. cerevisiae YLR177w geni, Gateway® Technology kullanılarak, ThermoScientific OpenBiosystems Yeast ORF Collections'dan pAG425GPD-ccdB hedef vektörüne alt klonlandı.



4. BULGULAR

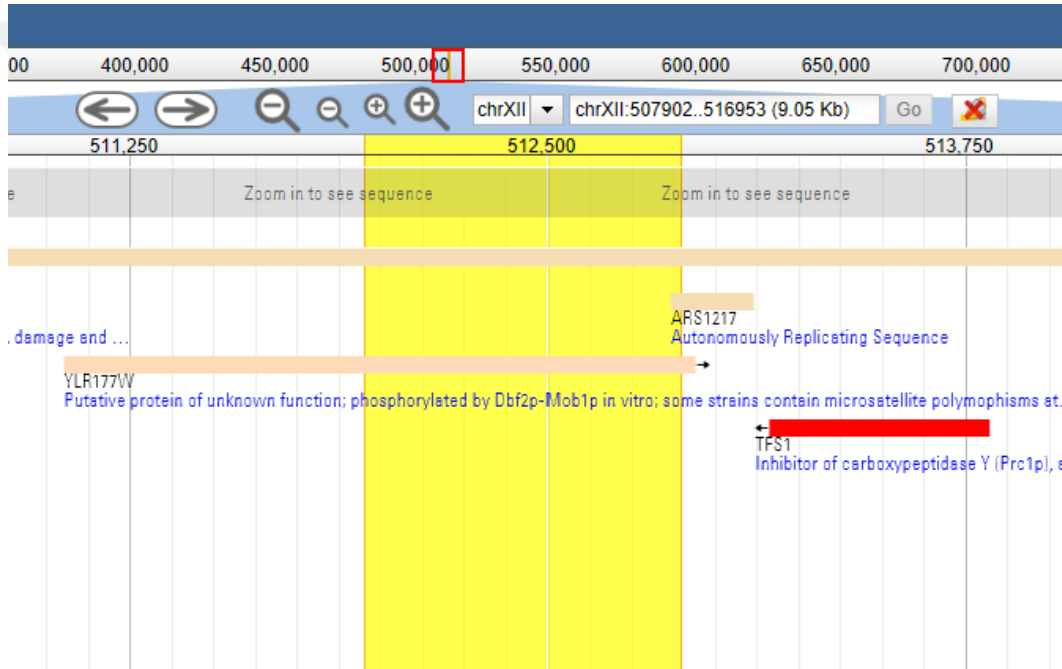
4.1. MIC, gDNA Kütüphanesinin Taranması ve İlaç Direnci Genlerinin Belirlenmesi

İlk olarak BY4741 *S. cerevisiae* maya suşu için YPD agar ortamındaki koşullar altında TIO için ölümcül dozları belirledik. İlacın farklı konsantrasyonlarını içeren agar plakaları üzerine bir dizi seri seyreltilmiş hücre çözeltisi damlattık. Hücreler 0.05 µg/mL' den daha fazla TIO tolere edemedi (Şekil 3A). Daha sonra, EUCAST mikrodilüsyon prosedürünü takiben sıvı YNB ortamında TIO'nun MIC değerini (büyümede % 50 azalma) belirledik. TIO'nun MIC değeri 0.025 µg/mL olarak karşımıza çıktı. Genel olarak, MIC analizi ve spotlama analizi birbiriyle uyumlu veriler sağladı. Tarama amacıyla, gDNA transforme edilmiş hücreleri, ilaçların öldürücü dozlarını içeren YNB plakalarına yaydık. Bir koloninin ilaca karşı daha az duyarlı olduğunu gözlemledik. Plazmidler bu koloniden geri elde edildi ve ilacın varlığındaki büyümeden sorumlu olduklarını doğrulamak için taze yabancı tip hücrelerini transforme etmek için kullanıldı. Onaylandıktan sonra plazmidler, vektöre özgü primerler (Yep13F1) kullanılarak sekanslandı. Dirençli koloninin, Maya 12. Kromozomu üzerinde bir DNA bölgesini içermiş olduğu saptandı. Bu DNA sekans dizisi Yeast Genome Database (<https://www.yeastgenome.org>) veri tabanında BLAST analizi yapmak için kullanıldı ve YLR117w isimli gene tekabül ettiği anlaşıldı (Şekil 2).

Sekans analizi yapılan DNA dizisi şöyledir;

```
TCGGCCCCGGGTTCCTGGGGGATCTGGAGTCGTCCAGTTTCAAGCGA
TTCAGTTCAGGGGCCACGACAATTCAGTGTTGTCCATGGAATAGTGGGAC
ATCATATCCTGATACATCTCCCACTCAAACCTGTTTGAATCATAAAATTTGG
AATCTATCGATAAATTGTTTCGGTATAGCACAAAGCCAAATTCTTGTTTTGTA
AAACTTAAAGAGTTCTTTGATCAGGTCTCTGAAATCATTACGCTCCTGGCAA
ATGTAGTAGAAAGTCAATTTCTTTCTGTCTGAATTGGAACCTCTGCATTCAATA
TTTTGATGTTCAACCCGCCACCGGAGTTATTGTTATTTAGCGACCTCAGTTTT
AGCTGTGCAATGTGAAGAGCCTTTAGCTCATCCTGGAATTTGTTGTGTAAAT
TCGTGGAGGATTCCCACGGGGTGGCAAATCTCAGAACCTGCTTTGATGGGA
TGATCAATTGCGTTAGTTCAATGATATCATATAACTTCGGATTCAACTCATG
AGCGACCGGCTTACCATTGGTTGTATCAACCAGAGTCTTGATAAACTGGTCA
```

TTGGGGAAATGCTGTTGACTATTGGTGATTAGAGAATCAAAGTGAATTTTTT
TCTTCAAAAAATTTATAAATAGTGCCAAATTTATATCTACAACCGGTTCCAC
CACCAAACTAAATCTTTACCACGATCACCATCAATAATGACCAAATCGCC
CCTTTTCAGTATAAGTGTGGCCGTTTGTGGTTTAGACAACAGTTCGAGCTTA
CCATTTTTTCAACGATACAAACACTAATGGCTTATAGTGCAAATGCATTGAA
GTGCTGTTCTTGGGATTTGGGCGCGCCCGGGTCGACGAAGCGTTTGAAACA
GCAGTGGAGATGAAATGGCGTCAGACTGTGGTTTGTAAATTCAGATTACCA
ATTTTCAAAAATTTCCAAAAGCTCTTATAATTCTGAACCTGAAGGGCGGAAG
AACAAATTAATTC



Şekil 4.1. Elde edilen DNA dizisi BLAST analizi

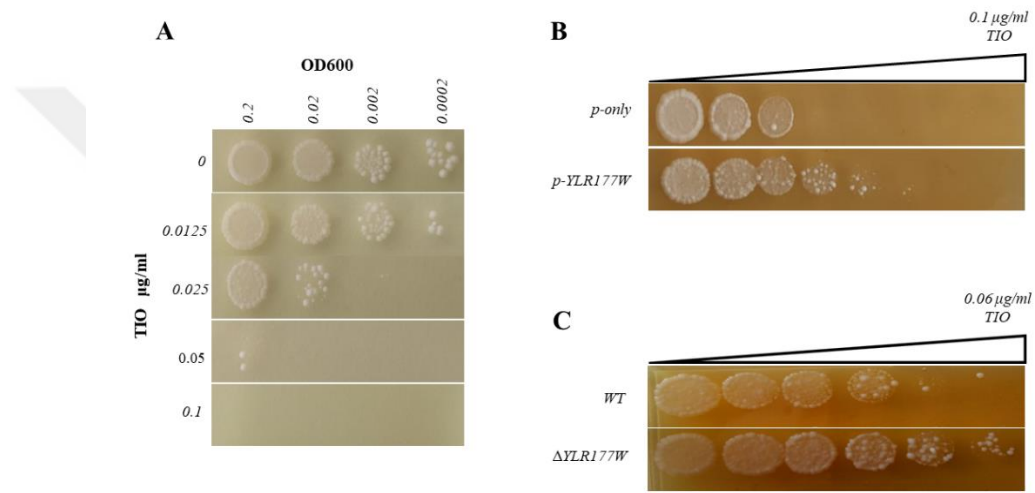
4.2. Dirençlilik Genlerinin Klonlanması Ve Yabani Tip Mayada Test Edilmesi

Gözlemlediğimiz duyarlılığın azalmasından sorumlu olduğunu doğrulamak için ilgili ekspresyon kasetinde bulunan *S. cerevisiae* geni (YLR177w), Gateway® Technology kullanarak, ThermoScientific OpenBiosystems Yeast ORF Collections'dan pAG425GPD-ccdB hedef vektörüne alt klonladık. Yabani tip hücrelerinde ekspresyon

bölgesi içerisinde bulunan genlerden, YLR177w geninin aşırı ekspresyonu, TIO duyarlılığını azalttığını gözlemledik (Şekil 3B).

4.3. Mutant Analizleri

Bu genin aşırı ifadesi ilaç duyarlılığını azaltırsa, silme işlemlerinin hücreleri ilaçlara duyarlı hale getirmesi gerektiğini düşündük. Bu nedenle, YLR177w'nin bulunmadığı delesyon mutantını, ilacın varlığında büyüme yeteneği açısından analiz ettik ancak YLR177w yokluğunda hücrelerin TIO'ya duyarlı hale gelmediğini gözlemledik (Şekil 3C).



Şekil 4.2. TIO direnç geni için spotlama analizi. (A) Belirtilen antifungal ilaç konsantrasyonları ile agar plakaları üzerinde büyüyen yabancı tip hücrelerin spot analizi. Hücreler seri olarak seyreltildi ve her spot için 5 ul'lik bir kısım damlatıldı. (B) YLR177w'yı aşırı eksprese eden vahşi tip hücreler TIO gradyanı içeren plakalar üzerinde büyütüldü. Boş plazmidli vahşi tip hücreler kontrol olarak kullanıldı (p-only). (C) Delesyon mutantları için spotlama analizi. Plakalar, ekimden sonra üç gün boyunca 30 ° C'de inkübe edildi ve fotoğraflandı.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında TIO dirençliliği sağlayan genleri bulmak için yapılan gDNA kütüphanesi taramasında *YLR177w* geni tespit edilmiştir. Bu genin bağımsız olarak klonlanması ve yabancı tip maya hücrelerinde ifade edilmesinin hücreleri dirençli hale getirdiği tespit edilmiştir. Fakat genin delesyonu ilaca karşı duyarlılık sağlamamıştır.

YLR177w geninin fonksiyonu bilinmemektedir ve esasi olmayan bir genidir. *YLR177w* Dbf2-Mob1 kinaz sistemi tarafından fosfotlanmaktadır. Dbf2 kinaz enzimi özellikle stres şartlarında aktive olan ve hücrelerin stres cevap yollarını aktive eden bir enzimdir. TIO ilaç uygulamasından sonra oluşan kimyasal stres şartlarında Dbf2 nin aktive olması ve *YLR177w* proteinini fosfotlayarak aktif hale getirdiği ve bunda TIO dirençliliği sağladığı tahmin edilmektedir. Fakat *YLR177w* proteinin nasıl bir mekanizma ile Tio dirençliliği sağladığı bilinmemektedir.

Sistemik antifungallerin kullanımı 1950’li yıllarda başlamış ve antifungal ilaç sayısındaki artış anibakteriyal ilaçların gerisinde kalmıştır. Daha da önemlisi birçok mantar türü bu ilaçlara direnç geliştirmiştir (4).

Tıp alanındaki yeni gelişmeler: Kök hücre nakli, kemoterapi, karaciğer ve böbrek transplantasyonları, yoğun bakımda tedavi gerektiren hasta sayısının artmasına neden olmaktadır. Tedavilerde kullanılan geniş spektrumlu antibiyotikler, kortikosteroitler, yoğun bakım sürecinin uzaması, organ ve doku nakillerinde organ reddini engellemek için kullanılan ümminsüpresiflere bağlı sistemik mantar enfeksiyonlarının artışına neden olmakla birlikte hastanın yaşamını da tehlikeye sokarak çoğu zaman ölümüne de neden olmaktadır. Mantar enfeksiyonlarına karşı kullanılan antifungallere direnç gelişmesi tedavi süresin uzatırken farklı ilaçların kullanılmasına neden olmaktadır. Bu zorunlu ve uzayan tedavilerde kullanılan ilaçların karaciğerde, böbreklerde ve beyinde birikmesi toksisiteye ve organ yetmezliklerine neden olabilmektedir. Ülkemizde gerçekleştirilen başarılı organ transplantasyonlarının mantarlara karşı gelişen dirençlilikten dolayı, hastaların kaybı bu alandaki başarıların ve tedavi yöntemlerinin olumsuz yorumlanmasına neden olmaktadır (3).

Dirençlilik mekanizmaları hasta yatağı başında hızlı moleküler tanı araçlarını geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. İlaç duyarlılık testleri en erken 48 saat içinde

sonuç verebilmektedir. Bu süre bağışıklık sistemi zayıflamış hasta gurubunda, önemli bir zamanın boşa geçmesine neden olmaktadır. Bu tür engelleri aşmak için ampirik tedavi uygulanmaktadır. Buda ilaç dirençliliğine neden olduğu gibi ekonomik olarak ek bir maliyet getirmektedir. Hastalığa neden olan mantarların duyarlılığı veya dirençli mi olduğunu erken tanımlamak için geliştirilmiş hızlı uygulanabilir yöntem, moleküler işaretleme ve RT-PCR yöntemi tiriazol gurubu antifungallere karşı dirençliliği gösterebilmektedir. Bu yöntem tiriazol gurubu ilaçların hedefindeki enzimlerde oluşmuş amino asit değişikliklerini ve diğer anlamda mantar suşlarının vermek istediğimiz ilaçlara karşı duyarlılığı dirençli mi olduğunu önceden gösterebilmektedir (41).

Antifungal ilaç dirençliliği, kanser ilaçları gibi ökaryotik hücrelerde stres yaratan önemli bir ilaç gurubuna karşı gelişen ilaç dirençliliği ile mantar ilaçlarına karşı gelişen ilaç dirençliliği benzerlikleri ve farklılıkları varsa ortak yolların tanımlanmasına hatta yeni ilaçların geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Kanser ilaçları ile antifungal ilaçların etki mekanizmaları ile ilaçlara karşı gelişen direnç mekanizmaları önemli ölçüde benzerlik göstermektedir. Bu benzerlik mayalardaki dirençliliğe neden olan yolların önemini göstermektedir (42).

Mantar ilaçlarına ve kansere karşı kullanılan ilaçlara gelişen direnç benzer mekanizmaların aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Griseofulvin adlı mantar ilacı mikrotübülerin stabilizasyonu ve p53 aktivasyonu ile fungusit etki göstermekte, bu özelliğinden dolayı vinbastin ile birlikte kullanıldığında MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu sinerjik bir şekilde inhibe etmektedir (43).

Dirençlilik araştırılırken, ilaç pompaları dışındaki savunma yöntemleri de araştırılmalıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bulduğumuz YLR177w geninin aşırı ekspresyonu, TIO duyarlılığını azalttığını gözlemledik. YLR177w'nin bulunmadığı delesyon mutantını, ilacın varlığında büyüme yeteneği açısından analiz ettik ancak YLR177w yokluğunda hücrelerin TIO'ya duyarlı hale gelmediğini gözlemledik.

Bu çalışmada YLR177w geninin aşırı ifade edilmesi durumunun maya mantarında TIO dirençliliği sağladığı tespit edildi. Fakat bu genin klinik olarak önemli olan izolatlarda dirençlilik ile ilgisi olup olmadığı hususunda bir bilgi mevcut değildir. Sonraki aşamalarda TIO dirençli klinik bakımdan önemli mantar türlerinde YLR177w geninin statüsü araştırılabilir ve ilaç dirençliliği ile ilgisi ortaya çıkartılabilir.

KAYNAKLAR

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews* 2007, 20:133-63.
2. Imhof A, Schneemann M, Schaffner A. Medikamente zur invasiven antifungal Therapie. *Schweiz Med Forum*. 2005, 5: 136-44.
3. T.C. Sağlık Bakanlığı, Komposit doku transplantasyonu bilimsel danışma komisyonunun 16.05.2012 tarihli toplantısı sonrasında yapılan ve “Hasta A.K.’nın ölüm nedenini belirleyen” basın açıklaması, *Sabah gazetesi*, 2012 12 Mayıs 2020
4. Samie A. Diversity of respiratory yeast from HIV infected patients with tuberculosis, their drug resistances and biofilm formation. *African Journal of Microbiology Research*. 2012, 6: 257-66.
5. Gubbins PO, Anaissie EJ. Antifungal therapy. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. (eds). *Clinical Mycology*, 2nd ed. London, Churchill Livingstone, 2009: 161-95.
6. Roemer T, Krysan DJ. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches, *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014, 4: 1-16.
7. Dalgıç N, Erdal İ. Sistemik Etkili Antifungal İlaçlar, *Klinik Pediatri*, 2005, 4(3): 90-8.
8. Yeğenoğlu Y. Antifungal Direnci Gösteren Mantarlar. *ANKEM Dergisi*. 2012, 26:254-60.
9. Gündüz E, Türkan İ. (Çeviri editörleri). Funguslar. İçinde: Yaşam biyoloji bilimi. The Science of Biology. Sadava D, Hilis DM, Heller HC, Berenbaum MR. 9. Baskı, Ankara Palme yayıncılık, 2014: 626-27.
10. Walker GM. *Yeast physiology and biotechnology*, Wiley and Sons, 1998: 1-17.
11. Seidl M. Industrial uses of fungi. *The Environmental Reporter*, 2009, 4(9): 17.

12. CLSI. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard-Second Edition*. CLSI document M38-A2. Wayne ,PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
13. Klis FM, Boorsma A, Groor PWJ. "Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*" *Wiley Inter. Science*, 2006,23:185-202.
14. Money NP. Fungal diversity. In: Watkinson SC, Boddy L, Money NP (eds). *The Fungi Acadmic Press*, Boston, 2016 :1-36.
15. Kahraman A. *Saccharomyces cerevisia* 'da Asit stresin suc² Gen Ekspresyonununa Etkilerinin Genetik ve Biyokimyasal Analizi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi, Bursa, Uludağ Üniversitesi, 2016.
16. Madigan MT, Mertingo JM. *Brock*. Çeviri: Çökmüş C. *Mikroorganizmaların Biyolojisi*, 11. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2010:491-500
17. Olson MV. Genome structure and organization in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Pringle JR, Broach JR, Jones EW (eds). *The molecular biology of the yeast Saccharomyces genome dynamics, protein synthesis and energetics*, New York, Cold Spring Harbor Press, 1991: 1-39.
18. Kayaalp O. *Antifungal antibiyotikler ve diğer antifungal ajanlar*. Tıbbi Farmakoloji. Ankara.10. baskı. 2002:301-9.
19. Medoff G. The mechanism of action of amphotericin. In: Bossche HV, Mackenzie DWR, Cauwenbergh G (eds). *Aspergillus and Aspergillosis*, Boston, MA, Springer, 1988: 161-4.
20. Lass-Flörl C, Perkhofer S. *In vitro* susceptibilitytesting in *Aspergillus species*. *Mycoses*, 2008, 51: 437-46.
21. RX Media Pharma, 2019. <http://www.rxmpws.com> 28.06.2020.
22. Erbakan N. *Derinin mantar hastalıklar*, 1. Baskı. Ankara, Türkiye Klinikleri Kitabevi, 1989:118.

23. Metin DY. Antifungal tedavide yenilikler. Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Metin DY. Beşinci Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Kitabı. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti*, 2007:185-7.
24. Balkovec JM, Hughes DL, Masurekar PS, Sable CA, Schwartz RE, Singh SB. Discovery and development of first in class antifungal caspofungin (CANCIDAS®)—A case study. *Natural Product Reports*, 2014, 31(1):15-34.
25. Denning D. Echinocandins: a newclass of antifungal. *J Antimicrob Chemother*, 2002, 6:889–91.
26. Stone EA, Fung HB, Kirschenbaum HL. Caspofungin: An echinocandin antifungal agent, *Clin Ther*, 2002, 24(3):351-77.
27. Arıkan S, Rex J. Antifungal. Agents. In: Murray PR (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: *American Society of Microbiology Press*, 2007:p.1859-62.
28. Kutlu S. *Azol Grubu Antifungaller*. Kandidiyaz BAMÇAG Mantar Simpozyumu-1.Simpozyum Kitabı, 2009:38-9.
29. Yeğenoğlu Y. Antifungal Direnci, *ANKEM Dergisi*, 2014, 26 (Ek2): 254-60.
30. Stensvold CR, Jorgensen LN, Arendrup MC. Azole-resistant invasive aspergillosis: Relationship to Agriculture. *Curr Fungal Infect Rep*, 2012,6:178191.
31. Önder Ş. Farnesolün Tek Başına ve Antifungal İlaçlarla Kombine Olarak *Aspergillus* Klinik İzolatlarına İn vitro Etkisinin Araştırılması, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı, Doktora Tezi, Eskişehir: Osman Gazi Üniversitesi, 2019.
32. Verweij PE, Howard SJ, Melchers WJG, Denning DW. Azole- resistance in *Aspergillus*: Proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resistance Updates*, 2009,12:141-7.
33. K.Shahri KG. Derinin Yüzeyel Mantar Enfeksiyonlarında Yerel Tioconazole, Clotrimazole, Siklopiroksolamin ve Naftifine'nin Etkinliklerinin Karşılaştırılması. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilimdalı, Doktora Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 1994.

34. Akyıldız T. Tioconazol'un Sürekli Akış İnjesiyon Analizi, UV Spektrofotometrik ve Titrimetrik Yöntemler İle Miktar Tayini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, 2004.
35. Ener B. *Candida* İnfeksiyonlarında Epidemiyoloji ve Laboratuvar Tanı. *ANKEM Derg*, 2008, 22 Ek(2): 263-74.
36. Odabaşı H. Kan Kültürlerinde İzole Edilen *Candida* Türlerin Tanımlanmasında ve Antifungal Duyarlılığın Araştırılmasında Standart ve Yeni Yöntemlerin Karşılaştırılması, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı, Uzmanlık Tezi, Samsun: 19 Mayıs Üniversitesi, 2016.
37. Şeker S. Yatarak Kemoterapi Alan Hematolojik Maligniteli Hastalarda Antifungal Tedavilerin Etkinliğinin Değerlendirilmesi, İstanbul Tıp Fakültesi İç hastalıkları Anabilim dalı, Uzmanlık Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2015.
38. Johnson EM, Cavling-Arendrup M. Susceptibility test methods: Yeasts and filamentous fungi. In: Jorgensen JH, Pfaller MA (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 11th ed. Washington, ASM Press, 2015: 2255-81.
39. Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for fermentative yeasts. *Eucast Definitive Document Edef*, 2017: 7.3.1.
40. Metzenberg RL, Grotelueschen JS. Disruption of essential genes in *Neurospora* by RIP. *Fungal Genet Newslett* 1992, 39:37-49.
41. Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res* 2009, 9(7):1029-50.
42. Mukherjee PK, Leidish SD, Isham N, Leitner I, Ryder NS, Ghannoum MA. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47(1): 82-6.
43. Rathinasamy K, Jindal B, Asthana J, Singh P, Balaji PV, Panda D. Griseofulvin stabilizes microtubule dynamics, activates p53 and inhibits the proliferation of MCF-7 cells synergistically with vinblastine. *BMC Cancer* 2010, 10:213.

EKLER

EK:1 ÖZ GEÇMİŞ

ÖZGEÇMİŞ

1. GENEL

Adı : Salman
Soyadı : KOÇ
Doğum Tarihi ve Yeri : 01.03.1972, MALATYA
E-mail : salmankoc@hotmail.com
Medeni Durum : Evli
Yabancı Dil Durumu : İngilizce (az) Fransızca(az)

2. EĞİTİM

1988-1992 : Malatya Gazi Lisesi

1994-1996 : İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar

2008-2012 : İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
2010-2012 : İnönü Üniversitesi Pedagojik Formasyon Sertifikası Eğitimi
2017-Halen : İnönü Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Eğitimi

3. MESLEKTE DENEYİM

2003-Halen İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Biyolog olarak görev yapmaktayım

2001-2003 Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinde Laborant olarak görev yaptım.
1998-2000 İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Patoloji Laboratuvarı laborant olarak görev yaptım.

EK:2 ETİK KURUL ONAYI

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÖNETİM KURULU KARARI

OTURUM TARİHİ	OTURUM SAYISI	TOPLANTI SAYISI
21.11.2018	50	2018/50-09-01
Enstitümüz Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı yüksek lisans programı öğrencilerinden tez konuları belirlenen Kübra DURMUŞ, Yılmaz SUSUZ ile Salman KOÇ'un tez çalışmaları için etik kurul onayına gerek olmadığına ilişkin Anabilim Dalı Başkanlığının 06.11.2018 tarih ve E.84999 sayılı teklif yazısı ile 31.10.2018 tarihli ortak doktora tez sınav tutanağı görüşüldü. Yapılan görüşmelerden sonra; Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı yüksek lisans programı öğrencilerinden Kübra DURMUŞ, Yılmaz SUSUZ ile Salman KOÇ'un tez çalışmalarında, etik kurul kararı gerektirecek insan yada hayvan unsurları içermediğinden etik kurul onayına gerek olmadığına ilişkin tekliflerin kabulüne, konunun ilgili Anabilim Dalı Başkanlığına bildirilmesine oybirliği ile karar verildi. 		

BAŞKAN	Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ Enstitü Müdürü	İmza
--------	--	------

ÜYELER

Dr. Öğr. Üyesi Zekeriya ÇALIŞKAN Müdür Yardımcısı	İmza	Prof.Dr. Rukuye AYLAZ Üye	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa CANBOLAT Müdür Yardımcısı	İmza	Dr. Öğr. Üyesi Narin SADIKOĞLU Üye	İmza
Prof. Dr. Davut ÖZBAĞ Üye	İmza	RAPORTÖR Sultan ÖZKAN Enstitü Sekreter V.	İmza