



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

***MUCOR CIRCINELLOIDES MAYA VE KÜF
FORMUNUN VİRÜLANSININ GÖSTERİLMESİ***

FUNDA KARAKURT

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2019



***MUCOR CIRCINELLOIDES* MAYA VE KÜF FORMUNUN VİRÜLANSININ
GÖSTERİLMESİ**

Funda KARAKURT

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2019

Funda KARAKURT tarafından hazırlanan *MUCOR CIRCINELLOIDES* MAYA VE KÜF FORMUNUN VİRÜLANSININ GÖSTERİLMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Ayşe KALKANCI

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Başkan : Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Prof. Dr. Mustafa Alper ERGİN

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma Tarihi: 25/06/2019

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Funda KARAKURT

10/06/2019

MUCOR CIRCINELLOIDES MAYA VE KÜF FORMUNUN VİRÜLANSININ
GÖSTERİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Funda KARAKURT

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2019

ÖZET

Mucor circinelloides temel ve uygulamalı çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaya başlanan; tıbbi, endüstriyel, biyoteknolojik ve tarımsal öneme sahip Mucoromycotina alt şubesinde Mucorales takımında yer alan oksijene bağlı dimorfizm gösteren saprofitik bir mantardır. Biyodizel, karotenoid, organik asit üretimi gibi çeşitli biyolojik süreçleri incelemek için kullanılır. Bu mantarlar, diyabetik ketoasidoz, nötropezi veya ciddi cilt yaralanmalarına sahip bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde ölümcül sistemik enfeksiyonlara (zigomikoz veya mukormikoz) sebep olabilen fırsatçı insan patojenleridir. Bu çalışmanın amacı, *Mucor circinelloides*'in maya ve küf dönüşümünün gösterilmesi ve iki formun virülans özelliklerinin ortaya çıkarılmasıdır. Bu nedenle *Mucor circinelloides*'in anaerobik ve aerobik ortam koşullarında ekimleri yapılarak maya ve küf formları elde edilmiş, küf-maya ve maya-küf dönüşümleri gözlemlenmiştir. Elde edilen bu formlar direkt boyasız, laktofenol pamuk mavisi ve metilen mavisi ile mikroskop altında incelenmiştir. Daha sonra maya ve küf kolonileri ile hazırlanan süspansiyonlar enfeksiyon modeli olarak kullandığımız, mum güvesi olarak bilinen *Galleria mellonella* larvalarına enjekte edilmiş, maya ve küf formlarının virülansları araştırılmıştır. Yaptığımız bu çalışmada *Mucor circinelloides*'in maya ve küf formları arasında belirgin bir virülans farkının olmadığı saptanmıştır.

Bilim Kodu : 1039

Anahtar Kelimeler : *Mucor circinelloides*, virülans, dimorfizm, *Galleria mellonella*

Sayfa Adedi : 48

Danışman : Prof. Dr. Ayşe KALKANCI

DEMONSTRATION OF THE VIRULENCE OF *MUCOR CIRCINELLOIDES* YEAST
AND MOULD FORMS

(M. Sc. Thesis)

Funda KARAKURT

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

June 2019

ABSTRACT

Mucor circinelloides is a saprophytic fungi which has started to be widely used at basic and applied studies. It is classified under Mucorales order of subphylum Mucoromycotina. This fungi has medical, industrial, biotechnological and agricultural significance and showing dimorphism dependent on oxygen. This fungi is considered to opportunistic human pathogens which may cause lethal systemic infections (*zygomycosis*, *mucormycosis*) in immunocompromised individuals with diabetic ketoacidosis and neutropenia or severe skin injuries. The aim of this study was to show the transformation of *Mucor circinelloides* yeast and mould forms and to reveal the virulent characteristics of the these two forms. Therefore, by cultivating *Mucor circinelloides* at anaerobic and aerobic environmental conditions, yeast and mould forms were obtained and mould-yeast and yeast-mould transformations were observed. Yeast and mould forms were examined under the microscope with direct uncoloured, lactophenol cotton blue and methylene blue preparations. The suspension prepared from yeast and mould colonies were injected to, namely wax moth, *Galleria mellonella* larvae, which we use as infection model, the virulence of the yeast and mould forms was studied. In our study, it was determined that there was no significant difference between *Mucor circinelloides* yeast and mould forms in terms of virulence of fungi.

Science Code : 1039

Key Words : *Mucor circinelloides*, virulence, dimorphism, *Galleria mellonella*

Page Number : 48

Advisor : Prof. Dr. Ayşe KALKANCI

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca insani ve ahlaki değerleriyle örnek aldığım; birlikte çalışmaktan, öğrencisi olmaktan büyük onur duyduğum ve ayrıca tez çalışmamın her aşamasında bilgi birikimi, bilim insanlığı, yol göstericiliği, sabrı ve sevgisiyle beni yetiştiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Ayşe KALKANCI'ya,

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine ve çalışanlarına,

Birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum bütün asistan, doktora, yüksek lisans öğrencileri ve laboratuvar çalışanlarına,

Çalışmalarım boyunca ilgi, bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen canım arkadaşım Ülker Abdülmecit'e,

Süreç boyunca manevi desteklerini hep hissettiğim, bana inanan, birlikte hayatı yüceltmeyi başarabildiğim tüm dostlarıma,

Her zaman ve elbette özellikle bu süreçte maddi ve manevi destekleriyle, güzel temennileri yanımda olan aileme,

Hayatım boyunca verdiğim tüm kararlarda arkamda duran, şefkatiyle ve sonsuz sevgisiyle beni büyüten, yüreklendiren yaşantıma her zaman kolaylık, rahatlık ve huzur sağlayan Canım Annem'e,

Bu zorlu süreçte ve şüphesiz her zaman sonsuz sevgi ve sabrıyla hep yanımda olan hayat arkadaşım, canım eşim Övünç KARAKURT'a yaşattığı tüm güzellikler ve her şey için

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mucoromycotina'nın Genel Özellikleri	3
2.1.1. Taksonomi ve filogeni	6
2.2. <i>Mucor circinelloides</i> Morfolojisi	7
2.2.1. Küf formu.....	8
2.2.2. Maya formu.....	9
2.3. Dimorfizm	9
2.3.1. Termal dimorfizm.....	11
2.3.2. Oksijene bağlı dimorfizm.....	11
2.4. Mantarlarda Virülans.....	12
2.5. <i>Mucor circinelloides</i> 'in Klinik ve Endüstriyel Önemi.....	13
2.5.1. <i>Mucor circinelloides</i> 'in klinik önemi	13
2.5.2. <i>Mucor circinelloides</i> 'in endüstriyel önemi	14

	Sayfa
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Örneklerin Hazırlanması.....	17
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	18
3.2.1. Kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri	18
3.2.2. Kullanılan besiyerleri	18
3.2.3. Kullanılan kimyasal maddeler.....	18
3.3. Yöntemler.....	19
3.3.1. Besi yerlerinin hazırlanması.....	19
3.3.2. Laktofenol pamuk mavisi ile mikroskopik inceleme	19
3.3.3. Metilen mavisi ile mikroskopik inceleme	19
3.3.4. Direkt boyasız mikroskopik inceleme.....	20
3.3.5. Kullanılan <i>Galleria mellonella</i> enfeksiyon modeli	20
4. BULGULAR	23
4.1. Küf-Maya /Maya-Küf Dönüşümü İnkübasyon Sonuçları	23
4.2. <i>Galleria mellonella</i> Enfeksiyon Modeli Sonuçları	25
5. TARTIŞMA	29
6. SONUÇ	39
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	47

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 5.1. Mucorales'in virölans özellikleri ve bunların mukormikoz için tanı ve tedavi geliştirilmesi olasılıkları	38

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Mucoromycotina mantarlarının üreme döngüleri	5
Şekil 2.2. Hif örnekleri	5
Şekil 2.3. Mantarlar aleminin güncellenmiş son taksonomisidir.(daha önce Zygomycota şubesinde bulunan organizmalar koyu renkli bölgede gösterilmiştir.)	7
Şekil 2.4. Dimorfik <i>Mucor</i> spp. sporangiyosporların alternatif morfojenetik yapıları.....	10
Şekil 3.1. <i>Mucor circinelloides</i> için oluşturan <i>G. mellonella</i> deney protokolü.....	22
Şekil 4.1. <i>Mucor circinelloides</i> 'in larvalara enjekte edilen küf formlarının Kaplan-Meier grafiği	26
Şekil 4.2. <i>Mucor circinelloides</i> 'in larvalara enjekte edilen maya formlarının Kaplan-Meier grafiği	26
Şekil 4.3. <i>Mucor circinelloides</i> 'in larvalara enjekte edilen “Maya1” ve “Küf2” formlarının Kaplan-Meier grafiği.....	27

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>Mucoromycotina</i> 'ya özgü kurdele benzeri katlanmalar/bölmesiz, düzensiz hif görünümü (laktofenol pamuk mavisi ile mikroskopik inceleme)	8
Resim 3.1. <i>Mucor circinelloides</i> 'in küf formunun laktofenol pamuk mavisi ile (solda) maya formunun metilen mavisi ile (ortada) ve direkt boyasız preparatta (sağda) mikroskopik incelenmesi.	20
Resim 3.2. Kullanılan <i>G. mellonella</i> larvaları (sağlıklı larvalar açık renkli, enfekte larvalar koyu renkli olarak görülmektedir.)	21
Resim 4.1. SDA'da <i>Mucor circinelloides</i> küf kolonisi (soldaki), laktofenol pamuk mavisi ile mikroskopik inceleme x40 (sağdaki)	24
Resim 4.2. SDA'da <i>Mucor circinelloides</i> maya kolonisi (soldaki), boyasız direk mikroskopik incelemede maya kolonisi x40 (sağdaki).	24

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

µg

Mikrogram

°C

Santigrat derece

µl

Mikrolitre

ml

Mililitre

Kısaltmalar

Açıklamalar

SDA

Sabouraud Dekstroz Agar

YPD

Yeast Extract Peptone Dextrose

SF

Serum Fizyolojik

NK

Natural Killer

GRP

Glukoz-Regulated Protein

AmB

Amfoterisin-B

PKA

Protein Kinaz A

CAMP

Siklik Adenozin Monofosfat

GLA

Gamma Linelonik Asit

DKA

Diyabetik Ketoasidoz

ITS

İnternal Transcribed Spacer

1. GİRİŞ

Mucor circinelloides Mucoromycotina alt şubesinde Mucorales takımında yer alan oksijene bağlı dimorfizm gösteren bir mantar türüdür. [1]

Mucor circinelloides, *Mucor* cinsindeki yaygın türlerden biridir. Genellikle toprak, gübre ve kök sebzelerde bulunan dünya çapında bir dağılıma sahiptir. Bu türün mikotoksin üretip üretmediği bilinmemektedir. Ancak sığır, domuz, kümes hayvanları, ornitorenk ve bazen de insanları enfekte ettiği bildirilmektedir. Genel olarak endüstride kullanılmakla birlikte, son yıllarda artan olgu raporları da bildirilmektedir. [2]

Mucorales takımındaki mantarlar yağ üretimi açısından potansiyel kaynaklardır. [3] *Mucor circinelloides* gamma linolenik asit (GLA) üretimi açısından önemlidir. Küf formunun oluşturduğu lipidin %30'lara varan seviyede GLA içerdiği ve GLA üretiminde kullanılabildiği belirtilmektedir. [4] Ayrıca *Mucor circinelloides* kaynaklı lipitlerin biyodizel üretimi için uygun bir hammadde olabileceği de bildirilmektedir. [5]

50'den fazla geçerli *Mucor* türü listelenmesine rağmen sadece 5 türün insan hastalıklarına yol açtığı bilinmektedir. Bunlar sıcaklığa karşı toleranslı türler olan *Mucor circinelloides*, *M.indicus*, *M.ramosissimus*, *M.hiemali* ve *M.racemosus*'tur. [6]

Mucor circinelloides enfeksiyonlarının gelişiminde konak faktörlerinin yanı sıra virülans faktörleri de önemli rol oynamaktadır. Diyabet, AIDS, hematolojik maligniteler, hematopoetik kök hücre/solid organ nakli veya travma gibi durumlarda bağışıklık sistemi baskılanmış hasta grubunda mukormikoz nedeni olduğu gösterilmiştir. [7]

Özellikle dimorfik mantarların büyük bir uyum yeteneğine sahip oldukları; konağa yerleştikleri sırada kendi yapılarında, hücre duvarlarının içeriğinde, metabolizmalarında, enzim sistemlerinde ve çoğalma biçimlerinde büyük değişiklikler oluşturabildikleri anlaşılmıştır. [8]

Doğal direncin veya kazanılmış direncin azaldığı durumlarda, potansiyel olarak patojen kabul edilen bütün mantarlar, uyum ve yayılma özelliklerini kullanarak mikoz etkeni

olabilir. Bu durum göz önüne alındığında "mantarların hastalık yapabilmelerinin" temel dayanağının veya bir başka anlatımla mantar patojenitesi ile ilgili temel mekanizmanın, "onların dokudaki ısıya ve diğer şartlara uyum gösterebilme ve konağın savunmasına karşı dayanma yeteneklerinde saklı" olduğu söylenebilir. [9]

Virülansın uyarılması pek çok faktörle ilişkilidir. Bunlardan biri mantarlardaki dimorfizmdir. Dimorfik mantarların tanımlanmasında her iki formun gösterilmesi ve birbirine dönüşümün tespit edilmesi gereklidir. Hif ve maya arasındaki bu morfolojik değişim farklı çevre koşullarında (besin, CO₂, sıcaklık) olabilmektedir. [10] *Mucor circinelloides*’ de bu morfolojik değişim anaerobik koşullarda maya, aerobik koşullarda hifal (küf) büyüme olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum dimorfik mantarların patogenezi, virülansı ve yaşam döngüsü için kritik öneme sahiptir. [11]

Çalışmamızda *Mucor circinelloides*’in virülans faktörlerinin incelenmesi mantarların genel virülans faktörleri (özellikle de *Candida albicans*’in virülans faktörleri) referans alınarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada *Mucor circinelloides*’in maya-küf dönüşümünün gösterilmesi ve her iki formunun ayrı ayrı virülans özelliklerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Hipotezimiz küf ve maya formları arasında in vivo virülans özelliklerinin birbirinden farklı olduğudur.

Bu sebeple *Mucor circinelloides*’in anaerobik ve aerobik koşullarda kültürü hazırlanıp maya ve küf dönüşümü gösterilecek, sonrasında maya ve küf formu ayrı ayrı *Galleria melonella* larvasına enjekte edilip deneysel enfeksiyon oluşturulacaktır. Oluşan enfeksiyonun virülansı değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mucoromycotina'nın Genel Özellikleri

Zygomycota mantarlar aleminin eski bir bölümüdür. Zygomycota üyeleri güncellenmiş taksonomide, Mucoromycotina alt şubesi içinde, Mucorales takımında sınıflandırılmıştır. Mucoromycotina'nın yaklaşık 1050 türü kapsadığı bilinmektedir. Çoğunlukla habitatlarda, toprakta veya çürüyen bitki veya hayvan artıklarında bulunurlar. Bazıları bitkilerin, böceklerin ve küçük hayvanların parazitleri olarak, bazıları ise bitkilerle simbiyotik ilişkiler kurarak yaşamını sürdürür. [12]

Mucoromycotina sporları hem seksüel hem de aseksüel yollarla oluşturulabilir. Mucorales'de sporangiyosporlar aseksüel olarak oluşturulur. Sporlar (sporangiyospor), bunları taşıyan özel hifaların (sporangiyofor) uçlarında oluşan büyük ve yuvarlak keseler (sporangium) içinde bulunurlar (Şekil 2.1). Sporangyumların patlaması ile sporlar dışarı saçılır, uygun ortam ve çevresel koşullar altında filizlenerek kendi türlerine özgü mantarları meydana getirirler. Bu sporların duvarları bazı türlerde sporopollenin içerir. Sporopollenin β -karoten oluşumunu sağlar; biyolojik ve kimyasal bozulmaya karşı oldukça dayanıklıdır. Hifleri koenositiktir (bölmesiz). Birden fazla haploid çekirdek içerir. [13]

Bununla birlikte hifler genetiksel olarak heterojen çekirdeklere sahip olan iki hifin bileşmesiyle oluşan heterokaryon bir yapı sergilemektedir. [14]

Havasal hifleri çok fazladır ve genellikle negatif gravitropizm ve iyi spor dağılımına izin veren pozitif fototropizm gösterir. Bu nedenle in vitro kültürde besi yerini dolduran ve kapağını iten koloniler oluştururlar. [15]

Zigosporlar, Mucoromycotina'nın cinsiyet organları olan seksüel sporlardır. Erkek ve dişi gametler ayrı hifalarda bulunurlar (heterotallik). İki farklı çiftleşme tipine (+) ve (-) sahiptir. Karşılıklı çiftleşme türleri, esas olarak trisporik asit ve öncülleri olmak üzere, karşıt iplikçik tarafından verilen uçucu feromonlar nedeniyle birbirlerine doğru büyür. Bu aktif hormon, aerial hifaların birbirlerine uzanmalarına ve değmelerine yardımcı olur. Bu

uzantılara zigofor adı verilmektedir. İki karşıt çiftleşme türü ilk temasa geçtiğinde, birkaç adımda zigosporu oluşturur. [7,13]

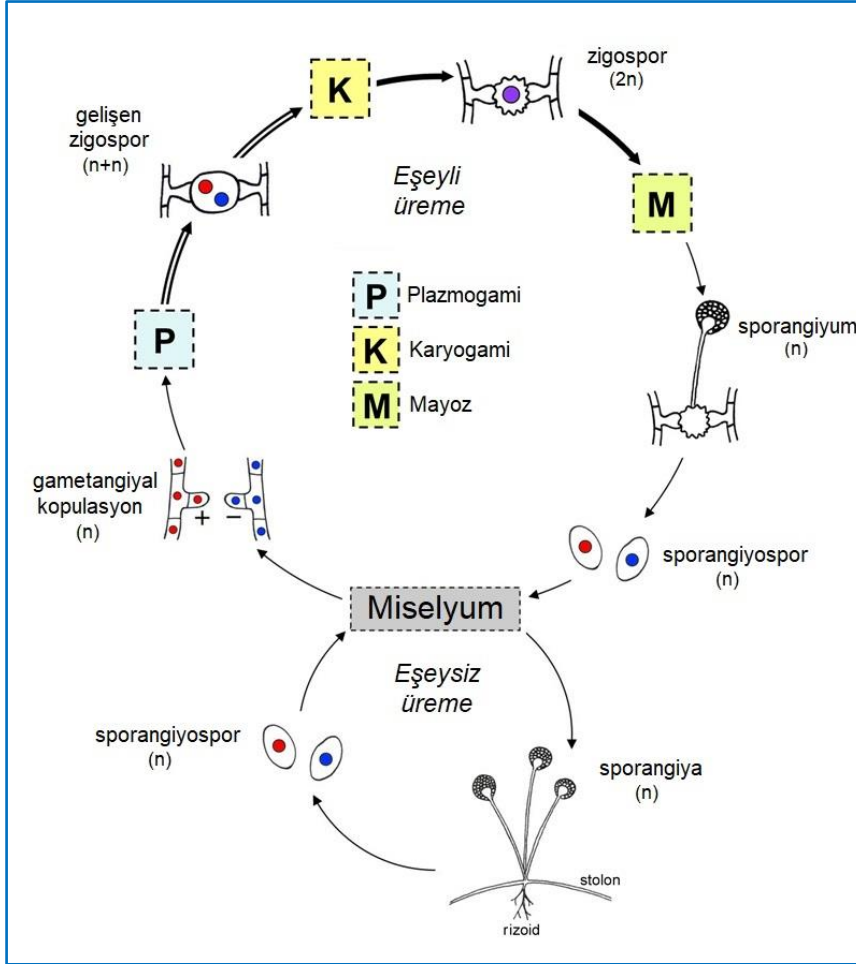
Trisporik asit, Mucorales takımında β -karoten ve retinol yolları ile sentezlenen bir C-18 terpenoid bileşiktir. Bu mantar türlerinde cinsel farklılaşmadan sorumlu bir feromon bileşigidir. [16]

Bazı Mucorales türlerinin, seksüel aktivitenin başlatılması için gerekli olduğu keşfedilmiştir. Daha sonra bu hormonun *Mucor mucedo*'da zigofor üretimine yol açan hormon olduğu gösterilmiştir. Bu etkileşimin, Goettingen Üniversitesi'nden Hans Burgeff tarafından, substrat ve atmosfer boyunca dağılmış düşük moleköl ağırlıklı maddelerin değiş tokuşundan kaynaklandığı bulunmuştur. Bu çalışma, herhangi bir mantardaki eşey hormonu aktivitesinin ilk gösterimini oluşturmuştur. [17]

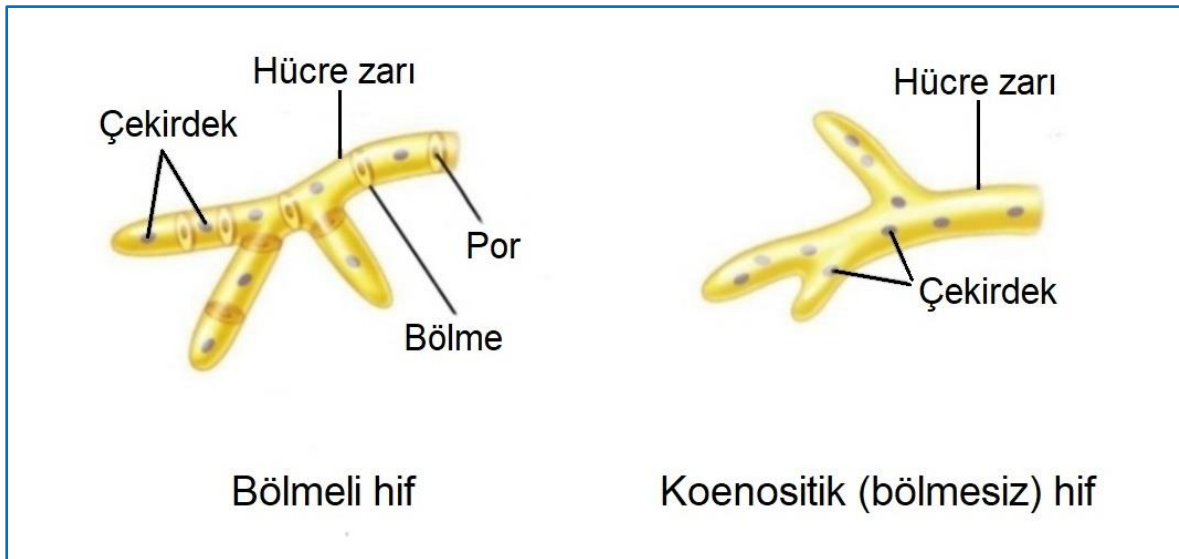
Mucorales, hücre duvarının özel bir yapısını gösterir. Mantarların çoğu yapısal polisakarit olarak kitin içerirken, Mucorales, kitinin deasetillenmiş homopolimeri olan kitosani sentezler. Mucorales takımı hücre duvarında beta gluklan bulunmaz. [18]

Mucoromycotina grubu mantarlar çevrede ve dokuda hif formları ile çoğalır. Bu hifler, bölmesiz (koenositik) olup geniştir (Şekil 2.2), dik açı ile dallanır ve dokuda kurdele gibi katlanır. Bu görünüm ile bölmeli hifleri olan diğer küf mantarlarından kolaylıkla ayrılabilir. [19]

Bu grup mantarların bulaşında çevredeki sporların inhalasyonu en önemli yol olarak düşünölmektedir. Perkütan bulaş yolları da kütanöz ve subkütanöz tutulumda önemli rol oynamaktadır. Sporların travmatik olarak deriye doğrudan inokölasyonu, dövme, kateter girişim bölgeleri ve enjeksiyon yerlerinde iğne-batması, sinek-böcek ısırılmaları sonucu bulaş bu şekilde bulaşın örnekleridir. Ayrıca, hastane ortamında steril olmayan bantlarla ilişkili yara mukormikozu olguları ile de karşılaşıldığı bildirilmiştir. [19]



Şekil 2.1. Mucoromycotina mantarlarının üreme döngüleri. [20]



Şekil 2.2. Hif örnekleri [14]

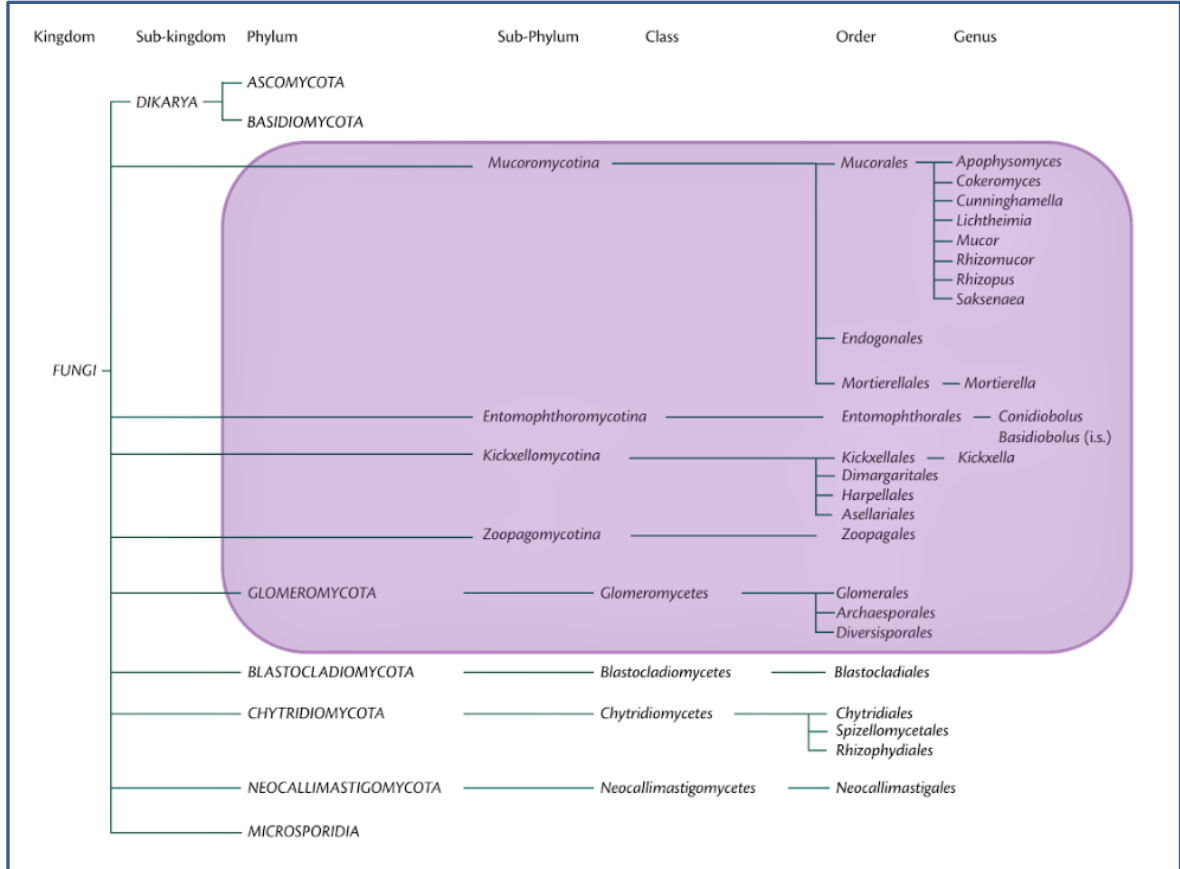
2.1.1. Taksonomi ve filogeni

Zigospor üreten mantarlar Zygomycota'ya yerleştirilmiştir. Moleküler çalışmalar ve sahip olduğumuz DNA bilgisi arttıkça Zygomycota yeniden sınıflandırılmıştır. [12]

Zygomycota son güncellenen çalışmalarla şube (filum) Glomeromycota ve dört alt şube (subfilum) arasına yayılmıştır. Mucoromycotina, Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina ve Zoopagomycotina olarak dört alt şubeye ayrılmıştır. Mucoromycotina içindeki Mucorales takımında tıbbi önemi olan üyeler bulunmaktadır. [21] Güncellenen son filogenetik sınıflandırma Şekil 2.3’de gösterilmiştir.

Mantarların eski sınıflaması fenotipik verilere dayanmakta iken günümüzde bu yaklaşım moleküler sistematik ile desteklenmekte ve filogenetik ilişkileri incelemektedir. Evrimsel olarak daha altta olan mantarlar Zygomycota şubesinde sınıflandırılırken Glomerulomycota şubesi ve dört alt şube ile yer değiştirmiştir. Dört alt şubeden ikisi Mucorales ve Entomophthrales denen zoopatolojik takımları içerir. Bununla beraber diğer iki büyük şube (Ascomycota ve Basidiomycota) filogenetik analizlerle desteklenmiştir. Ascomycota ya da (ascomycetes) sınıfı bilinen mantarların %60'ını insan patojenlerin %85'ini kapsar. Bunların dışındaki patojen mantarlar Basidiomycota (basidiomycetes) ve Glomerulomycota şubesinin Mucorales takımında yer alır. [10]

Morfolojik özellikler cins ve tür ayırımı için yeterli değildir. Küf ve mayanın bütün özellikleri ekolojik ve zamansal değişiklikler gösterir. Bu sebepten DNA bilgisi gerekmektedir. Tanı laboratuvarlarında klinik bir izolatın türü moleküler veya fenotipik metodlarla belirlenir (örn: DNA dizilemesi, üreme yapılarının morfolojileri, fizyolojik özellikler). Eşeyli üreme sınıflamada iyi bir yardımcıdır ve bir türün çaprazlamaya uygun kökenleri feromonlar ile uyarıldığında plasmogami, karyogami ve mayoz ile eşeyli üreme süreci sonlanır ve genetik bilgi değişimi gerçekleşir. Ancak klinik izolatların çoğu eşeysiz çoğalmaktadır. Patojen hale gelme evriminde, çoğu mantar eşeyli çoğalma yeteneğini kaybeder. Dolayısıyla klinik izolatlar eşeysiz üreme yapılarına göre sınıflandırılmaktadır. [10]

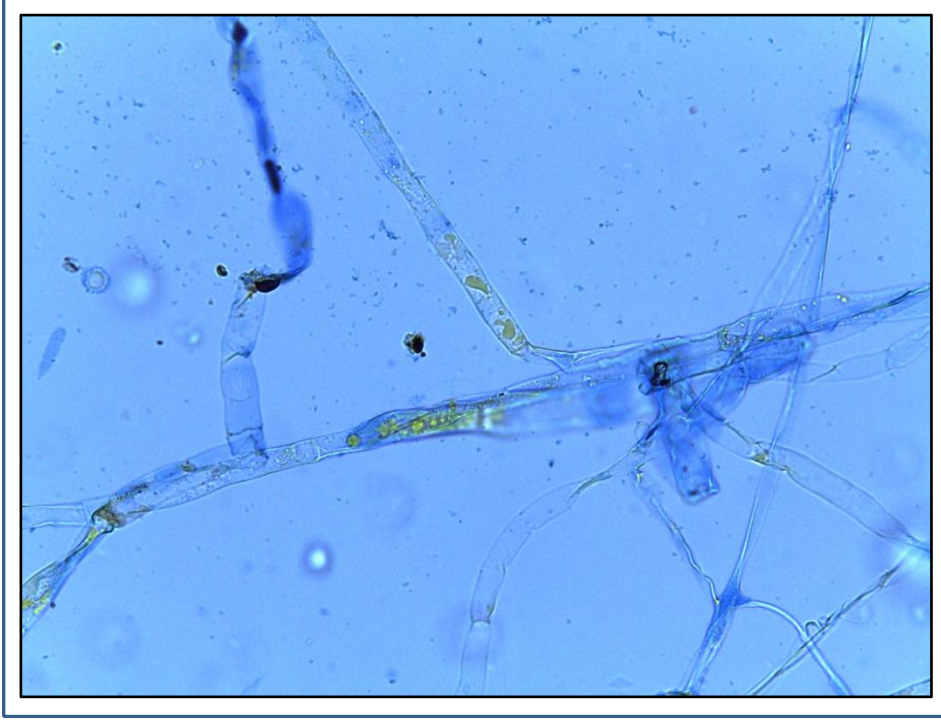


Şekil 2.3. Mantarlar aleminin güncellenmiş son taksonomisidir.(daha önce Zygomycota şubesinde bulunan organizmalar koyu renkli bölgede gösterilmiştir.) [1]

2.2. *Mucor circinelloides* Morfolojisi

Mucor circinelloides; *M. circinelloides* f. *circinelloides*; *M. circinelloides* f. *lusitanicus*; *M. circinelloides* f. *griseocyanus* ve *M. circinelloides* f. *Janssenii*, varyantlarını içeren değişken bir türdür.

Mucoromycotina (Mucorales) grubu bu mantarlar çevrede ve dokuda hif formları ile çoğalır. Bu hifler, bölmesiz olup geniş ve düzensizdir, dik açı ile dallanır ve dokuda kurdele şeklinde katlanan bir görünüm sergilemektedir. Bu görünümü ile septalı (bölmeli) hifleri olan diğer küf mantarlarından kolaylıkla ayrılabilir (Resim 2.1). [19]



Resim 2.1. Mucoromycotina'ya özgü kurdele benzeri katlanmalar/bölmesiz, düzensiz hif görünümü (laktofenol pamuk mavisi ile mikroskopik inceleme)

Mantarların çoğu bu iki formdan sadece birini sergilese de bazı mantar türleri dimorfik olup, çevre koşullarına (CO_2 , ısı ve besinler) bağlı olarak maya ya da küf şeklinde üreyebilmektedir. [10]

2.2.1. Küf formu

Hifler alt grup olarak, bir bölme (septum) ya da duvarla birbirinden ayrılmış bölmeler ya da hücreleri içeren iplikçiklere de ayrılabilirler. Hifler ayrıca pigmentli (esmer/dematisiyöz) veya pigmentsiz (hiyalen/saydam küf) de olabilir. Buna göre küfleri; bölmesiz hifli küfler (genellikle pigmentsiz), bölmeli hifli esmer küfler ve bölmeli hifli hiyalen küfler olarak üç gruba ayırmak mümkündür. Bu durum bazı mantar hastalıklarının sınıflandırılmasında fayda sağlayacaktır. [22]

Küf mantarları hava ve toprakta organik maddeler üzerinde yaşayan saprofit canlılardır. İnsanlarda enfeksiyon oluşturabilmeleri için solunum yoluyla alınmaları ya da deri teması gerekmektedir. Virülansları düşük olduğu için, dermatofitler dışındaki küf mantarlarının enfeksiyon oluşturabilmeleri aynı zamanda konak faktörlerine de bağlıdır. Küf

mantarlarının sahip olduğu virölans faktörleri hücre dışı enzimleri, bazı toksinleri, melanin üretimleri, siderofor içermeleri, hücre duvarındaki antijenik yapılar, konidyalarının şekli, solunum hücrelerine girebilme özellikleri ve konak faktörlerine gösterdikleri dirençtir. [23]

Çalışmamızda *Mucor circinelloides*'in küf formu oda sıcaklığında aerobik koşullarda SDA'da 3 gün içerisinde üretilmiştir. Mantara ilişkin içlerinde sporangiyospor bulunduran sporangiyumlar, septasız düzensiz hifler, Mucoromycotina'ya özgü kurdele benzeri katlanma yapıları mikroskopik incelemelerle gözlenmiştir.

Yapacağı hastalıkla birleşen hifal büyüme çevresel sağ kalımı yeni konakçılara bulaşmayı ve çiftleşme yoluyla genetik çeşitliliği teşvik ederek patogeneze katkı sağlamaktadır. [24]

2.2.2. Maya formu

Mayalar değişik şekil (küresel-elipsoid) ve 3-15 µm çaplarda olabilen tek hücreli mantarlardır. Çoğu maya tomurcuklanarak ürer. Maya kolonileri genellikle katı besiyerlerinde 37°C'de yumuşak opak 1-3 mm boyutlarında ve krem rengi koloniler oluşturmaktadır. Çoğunda koloni ve mikroskopik morfolojiler benzer olduğundan tanımlama fizyolojik testlere ve anahtar morfolojik farklara dayanmaktadır. [10]

Maya formu tek hücreli ve tek çekirdekli iken, filamentöz (küf) form çok hücrelidir. Bu durumun bir istisnası Mucorales'e ait mantarlarda (*Mucor* sp.) bulunur. *Mucor circinelloides*'de hem filamentli hem de maya büyümesi çok çekirdekli hücrelerde düzenlenmektedir. [25]

Mucor circinelloides oksijene bağlı dimorfizm gösteren bir mantardır. Anaerobik koşullar altında maya formunda bulunmaktadır. [26]

2.3. Dimorfizm

Patojenik mantarların, çok hücreli hifal büyüme formundan tek hücreli maya büyüme formu arasında geçiş yapabilme kabiliyeti dimorfizm olarak adlandırılmaktadır. Dimorfik uyarım, mantarın çevreyi algılamasını ve koşullara tepki vermesini gerektirir ve patojenite için gereklidir. [27]

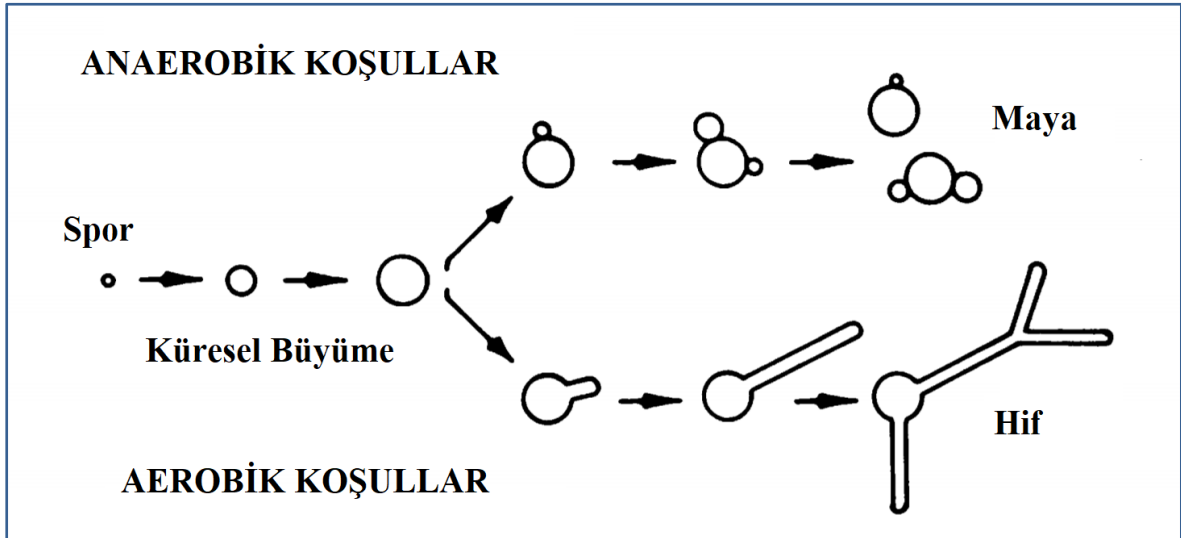
Dimorfik mantarlarda maya formuna dönüşüm patojenite için gerekli bir özelliktir. [25]

Küf formunun tam olarak bir dokuya girerek, daha küçük olan maya formunun ise yayılım yoluyla enfeksiyon oluşturabileceği düşünülmektedir. [28]

Dimorfik dönüşümün moleküler mekanizmaları hakkındaki bilgilerimiz, *Saccharomyces cerevisiae*’deki maya ve yalancı hife farklılaşma çalışmalarından elde edilmiştir. [25]

Birçok mantar tarafından paylaşılan ortak bir özellik morfogenezdeki ikili değişimdir. Dimorfik organizmalar iki vejetatif form arasında geçiş yapma kapasitesine sahiptir. Büyüme bir tomurcuklanma (maya benzeri) veya hifal bir şekilde meydana gelebilir. Çevresel işaretler (CO_2 , sıcaklık, besin türleri) organizmayı her iki büyüme modelini izlemeye yönlendirir. [11] Bu yönelim Şekil 2.4’de gösterilmiştir.

Sıcaklık, dimorfik dönüşümde baskın uyarıcı olmasına rağmen, CO_2 *Mucor circinelloides*’de dimorfik dönüşümü tetikleyen başlıca unsurdur. [29]



Şekil 2.4. Dimorfik *Mucor* spp. sporangiyosporların alternatif morfogenetik yapıları. [30]

2.3.1. Termal dimorfizm

Termal dimorfik mantarlar, sıcaklık değişimlerine cevap veren benzersiz bir patojen mantar grubudur. (22–25°C) hif büyümesini (37°C) ise maya büyümesini tetiklemektedir. [29]

Toprakta (22–25°C), bu mantarlar, hif olarak büyür ve konidyalara farklılaşır. Toprağın inşaat ya da doğal afetler gibi insan faaliyetleriyle bozulması konidyum ve hifal parçalarını havaya dağıtabilir. Bir memeli konakçının (37°C) akciğerlerine girdiğinde bu bulaşıcı partiküller patojenik maya formuna dönüşür. Enfeksiyon gerçekleşikten sonra maya hücreleri cilt, kemik veya beyin gibi organlara da yayılabilmektedir. [29]

Bağışıklık yetmezliği olması, normal floranın bozulması, diyabetlilerin asidozunda keton cisimlerinin birikmesi, fizyolojik değişiklikler gibi çeşitli sebepler fırsatçı mantar türlerinin sayısının artmasına ve kolonizasyonuna yol açabilmektedir. Fırsatçı mantarlarda termal dimorfizme rastlamak yaygın değildir. En sık görülen dört tür *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* ve *Rhizopus arrhizus*'tur. Bağışıklığı bozulmuş bireylerde hastalık yapabilen diğer fırsatçı mantarlar ile uzun bir liste oluşturulmaktadır. [31]

2.3.2. Oksijene bağlı dimorfizm

Dimorfizm, maya-hif dönüşümünü belirleyen bir süreç olup, önemli bir virülans faktörüdür. Bu süreç çevresel faktörlerden (CO₂, sıcaklık, pH, sıcaklık) etkilenir. Bu faktörler maya hücresinin reseptörleri tarafından algılanarak hücre içinde bazı iyonların miktarlarında değişiklik yaratırlar. Bu iyon akımı hifal uzamayı tetikler. Sinyalizasyon ve çevre koşullarının durumu mantarın hangi forma döneceğini şekillendirmiş olur. [32]

Mucor dimorfizmi Pasteur zamanından beri mikrobiyologları ilgilendiren bir araştırma konusu olmuştur. Oksijenden yoksun bırakıldığında, bu mantarlar küresel, çok kutuplu tomurcuklanan mayalar olarak büyürken, oksijen varlığında, dallanma koenositik (bölmesiz) hifa olarak yayılırlar. [30]

Bu morfolojilerin laboratuvarında gösterilebilmesi nedeniyle *Mucor* cinsi ökaryotik hücre morfogenezini incelemek için oldukça elverişli bir sistem olmuştur. [30]

2.4. Mantarlarda Virülans

Hastalık oluşturma yeteneğine sahip mikroorganizmalar patojen adını alır. Patojenin konakta hastalık oluşturabilme yeteneğine patojenite denir. Bazıları ancak konağın savunma mekanizmalarında yetersizlik olması durumunda hastalık oluşturabilir. Bu mikroorganizma fırsatçı patojen olarak adlandırılır. [33]

Patojenitenin derecesi virülans olarak tanımlanır. Bir mikroorganizmanın hastalık oluşturmalarını sağlayan özellikleri onun virulans faktörleridir. *Mucor circinelloides* fırsatçı patojendir. Diyabet, AIDS, hematolojik maligniteler, hematopoetik kök hücre nakli/organ nakli veya travma gibi durumlarda bağışıklık sistemi baskılanmış hasta grubunda mukormikoz etkeni olarak tanımlanmıştır. [7]

Virülans faktörleri, mikroorganizmaların konak savunma sistemleri tarafından yok edilmelerini önlemek üzere oluşturulan mikrobiyal ürünlerdir. Bu kapsamda, fungal virülans faktörleri fonksiyonlarına göre “kolonizasyonun başlamasını ve ilerlemesini sağlayan ile “konağa zarar veren” ürünler olarak sınıflanabilir. Bu faktörlerden bazıları; adezinler, fosfolipaz, pigmentler, üreaz, proteazlar, süperoksit dismutaz, katalaz, toksinler, mannitol, kapsül, hücre duvarı bileşenleridir. Kolonizasyonu başlatanlar; konak hücreleri ile sıkı bir bağlantı kurar. Konak hücrelerini işgal ederek, fagositoz ve kompleman gibi doğal savunma sistemlerine direnç sağlar ve özgül bağışık cevaptan kaçmayı kolaylaştırırlar. Konağa zarar verenler ise bir yandan mantarın dokuda yayılmasına yardım ederken, bir yandan da oluşturdıkları hasara karşı gelişen sitokin üretimi, inflamasyon gibi bağışık yanıtlara bağlı olarak doku hasarında artışa yol açarlar. [34]

Termal dimorfizm gösteren mantarlar bağışıklık sistemi zayıf olan kimselerde enfeksiyona sebep olabilirler. Çekirdeğin vücut sıcaklığına (37°C) adapte olma yeteneği ve maya morfolojisine geçişi virülans için çok önemlidir. Maya formuna geçiş konak dokulara yapışmayı, makrofajların büyümesini ve erimesini, uygun sitokin tepkilerini köreltmeyi ve hücre aracılı immunitiyi bozan spesifik virülans faktörlerinin düzenlenmesi ile bağlantılıdır. [29]

Küf ve maya arasındaki bu geri dönüşümlü geçişin düzenlenmesi sıcaklık, CO₂ ve eşey hormonları dahil olmak üzere sayısız uyarana adapte olmayı gerektirir. İn vivo transkripsiyonel profillemeye çalışmaları memeli konakçıklarda çoğalma ve virülans için önemli olan önceden tanınmayan genleri ortaya çıkarmaya başlamıştır. [24]

Mantarların virülans faktörleri genellikle maya mantarları ve en çok da *Candida* cinsi ile çalışılmıştır. [35]

2.5. *Mucor circinelloides*'in Klinik ve Endüstriyel Önemi

2.5.1. *Mucor circinelloides*'in klinik önemi

Mukormikoz (eski adıyla zigomikoz), Mucoromycotina alt şubesinde, *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor* ve *Lichtheimia* cinsinin neden olduğu, birçok sistemi tutan hastalıkların ortak ismidir.

Mucor circinelloides nadir de olsa ölümcül fungal enfeksiyon olan mukormikoz (zigomikoz) etkenidir. İnsana solunum, sindirim, deri yolu ile bulaşır Rinoserebral, pulmoner, kütanöz, gastrointestinal ve disemine olmak üzere başlıca beş klinik formu bulunmaktadır. [36]

Mukormikoz bağışıklığı zayıf olan hastalarda ortaya çıkan bir mantar enfeksiyonu olarak görülmektedir. Diabetes mellitus, kronik metabolik asidoz, deferoksamin tedavisi, demir şelasyon terapisi, immünsüpresyon, travma, intravenöz ilaç kullanımı, hematolojik malignite, hematopoetik hücre nakli, solid organ nakli, AIDS, kortikosteroid kullanımı, uzamış vorikonazol kullanımı, ciddi yetersiz beslenme risk faktörleri arasındadır. Bu organizmaların virülans özelliklerine hızlı büyüme hızları ve kan damarlarını istila etme yetenekleri de eklenmektedir. Sonuncu özellik vücutta yayılmalarına izin vererek, sonuçta enfekte olabilecek sayısız doku ve organa erişime izin verir. [37]

Diğer mantar enfeksiyonlarıyla karşılaştırdığında yüksek mortalite ile sonuçlandığı görülmektedir. Mukormikozun patogenezi hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu nedenle bu patojenleri incelemek için araştırmalara ihtiyaç vardır. [7]

Çoğu olgu bildiriminde *Mucor* cinsi tanımlanmadığı için hastalığın türlerle ilişkilendirilmesi zor olmaktadır. [38] Bir izolatın tür seviyesine göre belirlendiği durumlarda tek başına morfoloji güvenli değildir. Mevcut raporlar patojenik bir tür olan *Mucor*'un tür tanımlamasının yapılabilmesi için rRNA geninin ITS bölge dizisinin yapılmasını ön görmektedir. [6]

Deri mukormikozunun tanısı tam kalınlıkta bir deri biyopsisi ve uygun şekilde yapılmış ve tekrarlanmış kültürler sayesinde daha güvenilir şekilde konulmaktadır. [38]

Tıbbi ve cerrahi tedavinin birlikte uygulanması mukormikoz tedavisinde gereklidir. Son yapılan çalışmalarda hiperbarik oksijen tedavisi de cerrahi tedaviye ek olarak verilmektedir. [38] Öncelikle altta yatan hastalık iyileştirilmeli ve kontrol altında tutulmalı ardından cerrahi debridman ve amfoterisin B (AmB) ile medikal tedavi sürdürülmelidir. Lipozomal amfoterisin B formları yan etkilerinin az olması sebebiyle tedavide daha fazla tercih edilmektedir. [39]

2.5.2. *Mucor circinelloides*'in endüstriyel önemi

Mucor circinelloides karoten ve lipit kaynağı olarak da biyoteknolojik bir öneme sahiptir. Biyoreaktörlerde iyi bir biyokütle oluşturur, çok çeşitli karbon kaynakları kullanabilir ve endüstriyel karıştırılmalı tank fermentörlerinde büyüme kapasitesi göstermiştir. Günümüzde, *Mucor circinelloides* lipidleri özel bir ilgi kazanmıştır, çünkü *Mucor* biyokütlelerinin biyodizel üretimi için hammadde olarak bitkisel yağlara alternatif olabileceğini düşündürmektedir. [40]

Mucorales mantarları umut verici β -karoten kaynakları olarak kabul edilmektedir. Bunların arasında *Blakeslea trispora* zaten endüstriyel üretim için kullanılmaktadır. [41]

Son yıllarda karotenoid biyosentezini ve β -karoten üreticisi *Mucor circinellides*'deki regülasyonu netleştirmek için büyük ilerleme kaydedilmiştir. Birçok sebepten ötürü *Mucor circinelloides*'in karoten üretim çalışmaları için kullanılabileceği düşünülmüştür. [42]

Mucor cinsinin türleri proteazlar, lipazlar veya rennin gibi çeşitli enzimlerin endüstriyel üretimi için kullanılmaktadır. [42]

Ayrıca karotenojik yolakta yer alan yapısal genler klonlanmış ve ayrıca bir düzenleyici gende izole edilmiş ve analizi yapılmıştır. [42]

Mucor circinelloides'in morfolojik dimorfizmi potansiyel biyoteknolojik uygulamalar için büyük avantaj olmuştur. Maya morfolojisi, su altında büyümeye izin verdiği için fermentasyon endüstrisi tarafından tercih edilmektedir; biyokütle üretimi daha yüksektir ve hücreler ortamdaki daha kolay ayrılmaktadır. Dahası maya hücreleri 30°C'de iyi büyüebilmektedir. [42]

Bununla birlikte verimli bir transformasyon sistemi olmayışı nedeniyle moleküler teknikleri bu mantarlara uygulamak oldukça zordur. Fakat iyi gelişmiş transformasyon sistemlerinin varlığı ve eksojen genleri ifade edebilme yetenekleri *Mucor circinelloides*'i karotenojenik çalışmalarda geleneksel olarak kullanılan Mucorales'lerde moleküler tekniklere daha uygun hale getirmektedir. Karotenoid biyosentezinin moleküler biyolojisindeki bu gelişme, mikroorganizmalarda karotenoid yolunun modifiye edilmesinin ve tasarlanmasının yolunu açmıştır. [42]

Mucoromycotina alt şubesine ait Mucorales takımındaki, *Mortierella*, *Rhizopus* ve *Cunninghamella* GLA üretimi açısından önemlidir. *Mucor* cinsi küflerin oluşturduğu lipidin %30'lara varan seviyede GLA içerdiği ve GLA üretiminde kullanılabildiği belirtilmektedir. [43]

Tipik yağlı bir filamentöz mantar olan *Mucor circinelloides*, 1980'lerden bu yana GLA üretimini araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. γ -Linolenic acid (GLA) enflamatuvar bozuklukların, diyabetin, kardiyovasküler bozuklukların, kanserlerin ve diğer bazı hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için birçok tıbbi etkiye sahip önemli bir çoklu doymamış yağ asididir. Bu sebeple kullanılan bitki tohumları ve çuha çiçeği iklimden, mevsim değişikliklerinden kolayca etkilenmektedir Bu da yağların değişken miktarları ve nitelikleri ile sonuçlanmaktadır. [4]

Mucor circinelloides moleküler çalışmalara çok uygundur. Etkili dönüşüm sistemlerinin olması, eksojen genlerin bulunması onu biyoteknolojik gelişmelerin çekici bir hedefi haline getirir. [41] Dahası *Mucor circinelloides*'in genom dizisi yakın zamanda tamamlanmıştır. [44]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Hazırlanması

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikoloji Laboratuvarında daha önce yapılan başka bir çalışma [45] için hazırlanan ve -80°C de saklanan *Mucor circinelloides* kökenleri canlandırılmış, çalışmamızda canlandırılan bu kökenlerden daha önce DNA dizi analizi yapılmış tek bir köken kullanılmak üzere çoğaltılmıştır. [45]

Mucor circinelloides kültür koşullarına göre morfolojik evreler sergileyen bir mantar türü olduğu için ortamı üremeleri gözlemleyebileceğimiz şekilde düzenlenmiştir. [26]

Genotipik tanımlamalar *Mucor circinelloides*'in termotoleransı olan ve 37°C de iyi üreyen bir mikroorganizma olduğunu ortaya koymuştur. [45]

Mucor circinelloides'in 37°C de iyi bir şekilde ürediği bilinmektedir. [45] Bu durum göz önüne alınarak, SDA'ya yapılan küf ekimleri anaerobik jar içerisinde 37°C 'de inkübe edilmiştir. Beklentimiz maya dönüşümünü gözlemlemektir. Fakat maya üremesi olamamıştır.

Ardından küf üremesi gözlemleyebilmek için ekim yaptığımız petriler parafilmlelenip hem oda sıcaklığında hem etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat içinde küf üremesi başlamış fakat maya dönüşümünde bir ilerleme olmamıştır. 48 saat içerisinde oda sıcaklığında ve etüvde muhafaza ettiğimiz petrilerde küf oluşumunu gözlemlenmiştir. 72 saati aşkın süre sonunda maya formunu elde edilememiştir.

Anaerobik ortam koşullarında hava sızdırmaz kap ile oda sıcaklığında ($(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$) yaptığımız ekim sonucunda küf formunun maya formuna dönüşümü gerçekleştirilmiştir.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri

- Anaerobik jar
- Gas pack
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Cam eşyalar, özeler, petriler, enjektör, ependorflar, lamlar
- Çalkalayıcı (vortex)
- Derin dondurucu -20°C (Uğur, Türkiye)
- Derin dondurucu -80°C (Sanyo, Japonya)
- Etüv (Elektro-mag, Türkiye)
- Mikropipetler ve uçları (Beta pette™, ABD)
- Otoklav (Sanyo, Japonya)
- Otomatik pipet seti (Labmate, Türkiye)
- Parafilm
- Santrifüj cihazı (BOECO, Almanya)
- Sınıf 2 biyogüvenlik kabini (Metis biyoteknoloji, Türkiye)
- Tupperware saklama kabı 1 L (hava sızdırmaz kap)

3.2.2. Kullanılan besiyerleri

- Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) Besiyeri (bioMeriux, SA-France)

3.2.3. Kullanılan kimyasal maddeler

- Agar (Himedia, Hindistan)
- Etil alkol
- Laktofenol pamuk mavisi
- Metilen mavisi (Merck, Almanya)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Besiyerlerinin hazırlanması

Sabouraud Dekstroz Agar'ın (SDA) Hazırlanması

Besiyerinin içeriği:

Pepton	10g/L
D (+) Glukoz	20 g/L
Agar	17g/L
pH	5.6

Toz besiyerinden 65 g tartılarak alınmış ve üzerine 1 L distile su eklenmiştir. Otoklavda 121°C'de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir. Kalınlığı 4 mm olacak şekilde petrilere 25'er ml dökülerek katılaşıncaya kadar beklenmiştir. Kullanıma kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.3.2. Laktofenol pamuk mavisi ile mikroskopik inceleme

Ticari olarak sağlanan laktofenol pamuk mavisi, *Mucor circinelloides*'in küf formunun selofan bant yöntemi ile incelenmesinde kullanılmıştır.

Kısaca, koloni yüzeyine selofan bant hafifçe yapıştırılıp çekildikten sonra, üzerine laktofenol pamuk mavisi damlatılmış temiz bir lam üzerine yapıştırılmıştır. Mantara ilişkin içlerinde sporangiyospor bulunduran sporangyumlar, bölmesiz düzensiz hifler, Mucoromycotina'ya özgü kurdele benzeri katlanma yapıları önce x10'luk ardından x40'luk objektifte incelenmiştir (Resim 3.1). [46]

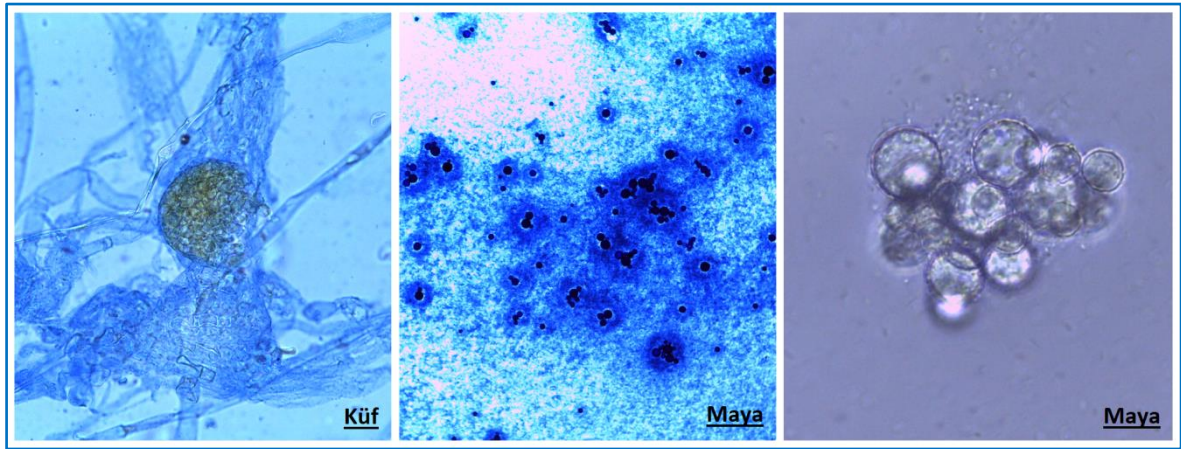
3.3.3. Metilen mavisi ile mikroskopik inceleme

Mucor circinelloides'in maya formunun incelenmesi için ticari olarak sağlanan metilen mavisi, hazırlayıp tespit ettiğimiz lam üzerine damlatılarak bekletilmiştir. Su ile yıkayıp kuruttuktan sonra x100'lük objektif ile inceleme yapılmıştır (Resim 3.1).

3.3.4. Direkt boyasız mikroskopik inceleme

Direkt inceleme için belirlenen yöntemler kullanılmıştır. [47]

İncelediğimiz *Mucor circinelloides*'in maya formundan aldığımız örnek lam üzerinde bir damla serum fizyolojik içerisinde ezilerek yayılmıştır. Üzeri içerisinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamel ile kapatılarak mikroskopta x40'lık objektifle incelenmiştir (Resim 3.1).



Resim 3.1. *Mucor circinelloides*'in küf formunun laktofenol pamuk mavisi ile (solda), maya formunun metilen mavisi ile (ortada) ve direkt boyasız preparatta (sağda) mikroskopik incelenmesi.

3.3.5. Kullanılan *Galleria mellonella* enfeksiyon modeli

Mum güvesi olarak bilinen *Galleria mellonella* gibi omurgasız canlılar, mikroorganizmaların virülansının ve konak yanıtının araştırılmasında kullanılmaktadır. Bu canlılar ekonomik olmaları, etik kurul onayı gerektirmemeleri ve kolayca uygulama yapılabilimleri nedeniyle avantajlıdır. [48]

Çalışmamızda *Mucor circinelloides*'in küf ve maya formunun virülansının araştırılması için *Galleria mellonella* enfeksiyon modelinden faydalanılmıştır. [48]

Çalışmamız için rastgele seçilmiş toplam 70 adet larva kullanılmıştır. Her larvanın arka sol bacak içine Hamilton iğnesi kullanılarak 10 µl maya içeren sıvı doğrudan uygulanmıştır.

Enfekte edilen larvalar 30°C’de inkübe edilerek her gün düzenli olarak canlı kalan larva sayıları belirlenmiştir (Resim 3.2). [49]

Galleria mellonella’nın 100 gram yarı sentetik besiyerinin hazırlanışı

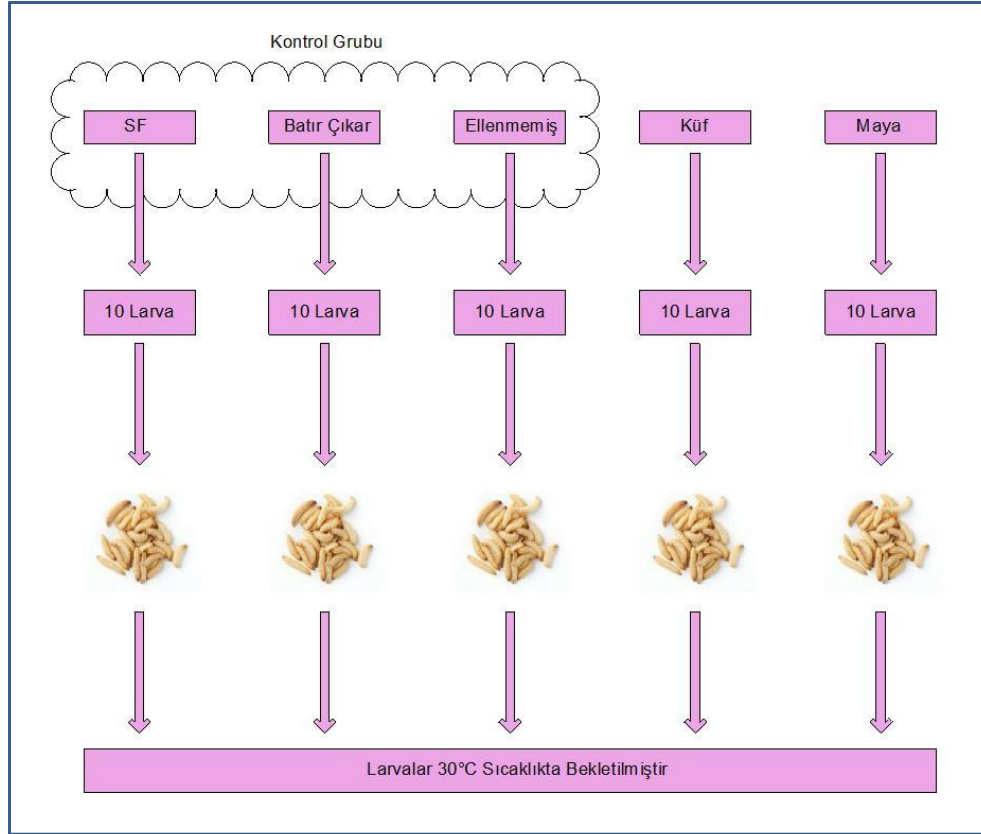
- 22 g buğday unu
- 22 g buğday kepeği
- 11 g süt tozu
- 5,5 g kuru maya
- 17,5 g balmumu
- 11 ml gliserin
- 11 ml bal

Deneylerde kullanılan *Galleria mellonella* larvalarının beslenmesi için yarı sentetik bir ortam hazırlanmıştır. Bu amaçla yukarıdaki belirtilen miktarlarda besin bileşenlerinden buğday unu, buğday kepeği, süt tozu, kuru maya, gliserin, bal ve su bir kap içine konulmuş ve iyice homojen bir hale gelinceye kadar karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışıma balmumu ilave edilerek karışımın homojenliği sağlanmıştır.



Resim 3.2. Kullanılan *G. mellonella* larvaları (sağlıklı larvalar açık renkli, enfekte larvalar koyu renkli olarak görülmektedir.)

Mucor circinelloides maya ve küf formunun virölansının değerlendirilebilmesi amacıyla enjeksiyon yapılan larva grupları için oluşturulan deney protokolü Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. *Mucor circinelloides* için oluşturan *G. mellonella* deney protokolü

4. BULGULAR

4.1. Küf-Maya /Maya-Küf Dönüşümü İnkübasyon Sonuçları

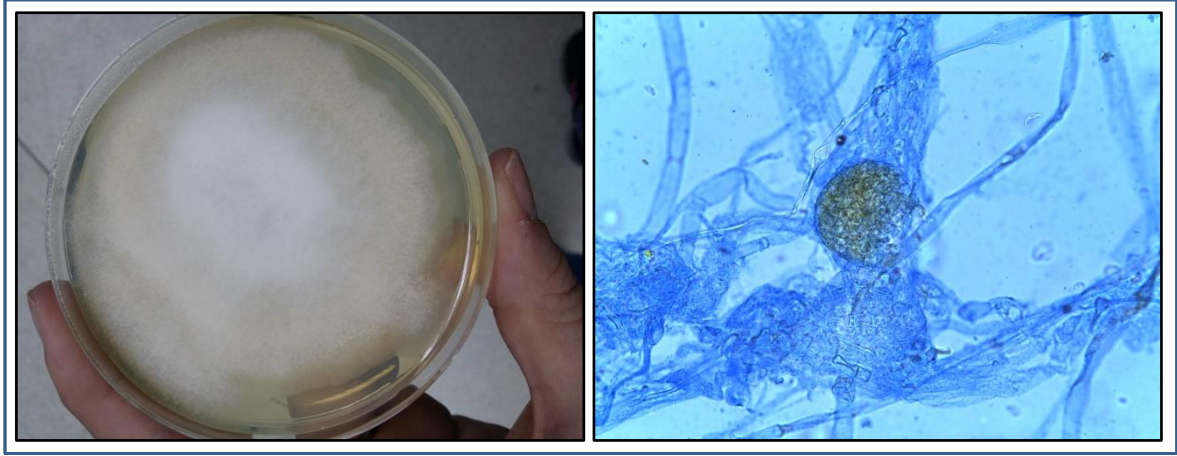
Laboratuvarında bulunan örneklerin ekimleri Sabouraud Dekstroz Agar'a (SDA) yapılmış ve $(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 'de etüvde 48-96 saatlik inkübasyonun ardından üreyen küf kolonisi tür düzeyinde tanımlama yapabilmek amacıyla laktofenol pamuk mavisi ile mikroskopik olarak incelenmiştir (Resim 4.1).

Kesin tanısı yapıldıktan sonra *Mucor circinelloides* Sabouraud Dekstroz Agar'a (SDA) tekrar ekilmiştir. Bu sefer hem maya formunu gözlemlemek amacıyla hem de küf formunun devamını sağlamak amacıyla farklı koşullarda pasajlanmıştır. Küf formu için $(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 'de etüvde 48-96 saatlik inkübasyon durumu sağlanmıştır.

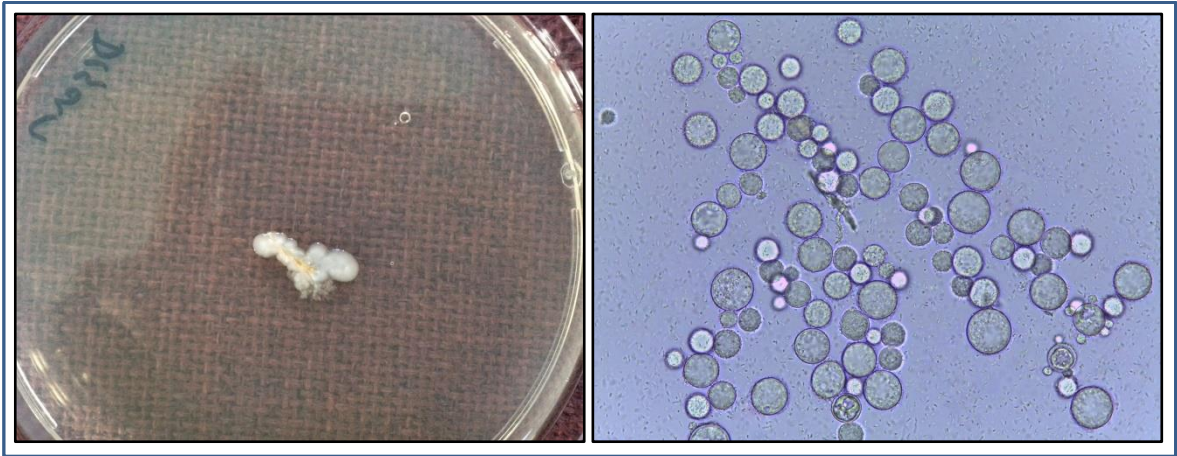
Maya formu için oksijensiz ortam yaratılması amacıyla anaerobik jar içerisine yerleştirilmiş $(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 'de etüvde 48-96 saatlik inkübasyon sonuçları gözlemlenmiştir. Küf kolonisi bu şartlar altında kolaylıkla ürerken, maya kolonisinde üreme olmamıştır.

Bu nedenle, hava sızdırmaz başka bir kap kullanılarak $(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 'de etüvde inkübasyon ortamı yaratılmıştır. Fakat 72 saati aşkın süre içinde maya kolonisi oluşumu yine gözlenememiştir. Küf kolonisinden tekrar ekim yapılan *Mucor circinelloides* bu defa hava sızdırmaz kap içerisinde oda sıcaklığında $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ inkübe edilmiştir. 96 saatlik bir sürenin ardından maya kolonisi gelişmiştir.

Kesin tanı amaçlı direk boyasız mikroskopik inceleme (Resim 4.2) ve metilen mavisi ile incelemenin ardından maya kolonisinin *Mucor circinelloides* olduğu kesinleşmiştir.



Resim 4.1. SDA'da *Mucor circinelloides* küf kolonisi (soldaki), laktofenol pamuk mavisi ile mikroskopik inceleme x40 (sağdaki).



Resim 4.2. SDA'da *Mucor circinelloides* maya kolonisi (soldaki), boyasız direk mikroskopik incelemede maya kolonisi x40 (sağdaki).

4.2. *Galleria mellonella* Enfeksiyon Modeli Sonuçları

Çalışmamızda *Mucor circinelloides*'in küf ve maya formlarını oluşturduktan sonra bir mum güvesi olan *Galleria mellonella* larvaları ile bir enfeksiyon modeli oluşturulmuştur. Bu sayede *Mucor circinelloides*'in küf ve maya formlarının oluşturduğu enfeksiyonun incelenmesi amaçlanmıştır. Bu virülans özelliği *Galleria mellonella* larvalarını öldürme güçleri üzerinden saptanmıştır.

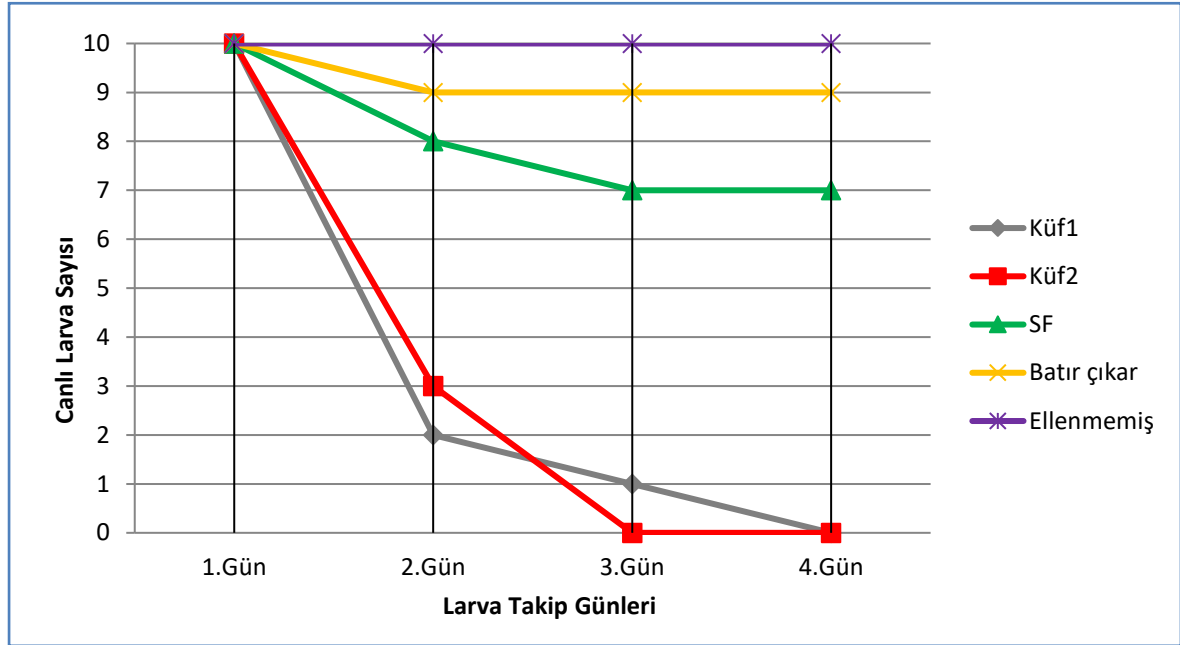
Mucor circinelloides'in hem küf ve hem maya halinde ayrı ayrı hazırlanan süspansiyonlarından 10 µl Hamilton enjektörü içine alınmış ve her gruptaki 10 larva son sol bacak önünden hemolenf içine yapılan enjeksiyon ile inokule edilmiştir.

Gruplandırma “Maya1”, “Maya2”, “Küf1”, “Küf2”, “SF”, Batır çıkar ve Ellenmemiş şekilde düzenlenmiştir.

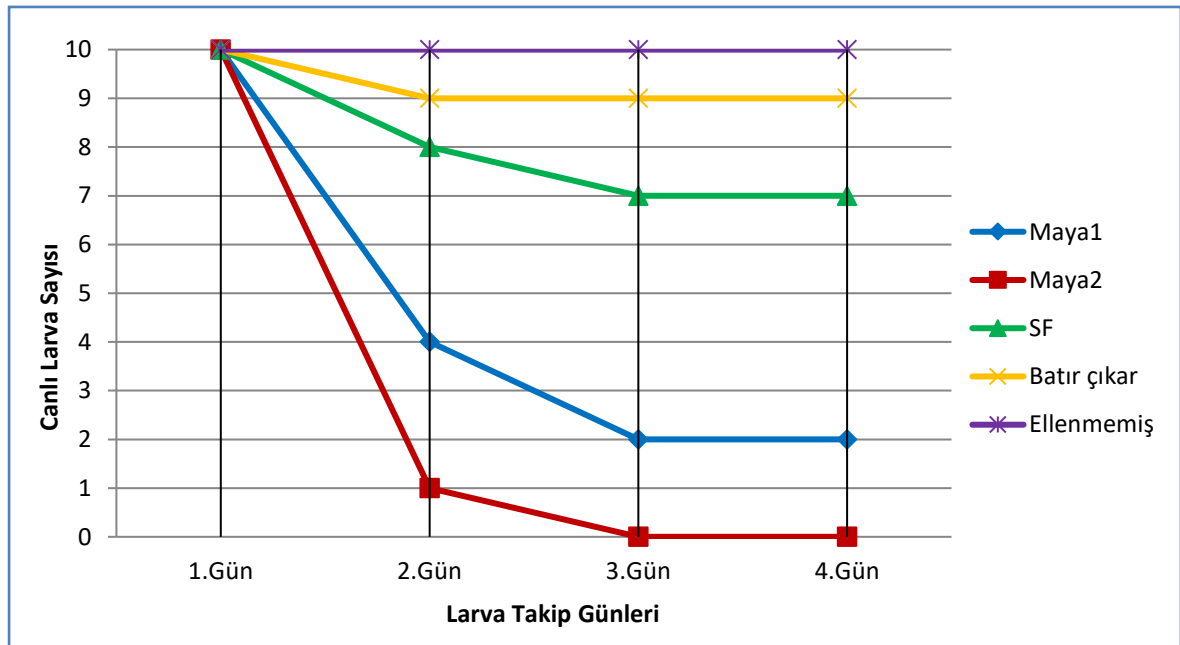
Enjeksiyon yapılan larva grupları içerisinde besin bulunan petrilere konulup 30°C’de etüvde bekletilmeye başlanmış ve her gün canlı larva sayıları kayıt altına alınmıştır. *Mucor circinelloides*'in deney protokolü Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız ellenmemiş kontrol grubu, enjektör batırıp çıkardığımız kontrol grubu ve SF enjeksiyonu yaptığımız kontrol grubu larvalarının canlı sayımı da her gün düzenli olarak yapılmıştır.

4. günün sonunda “Küf1” ve “Küf2” ile enjekte ettiğimiz larvaların tamamı canlılığını yitirmiştir (Şekil 4.1). “Maya1” ve “Maya2” de enfekte ettiğimiz larvalardan “Maya1” ile enfekte edilen 2 canlı larva dışında hepsi canlılığını kaybetmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. *Mucor circinelloides*'in larvalara enjekte edilen küf formlarının Kaplan-Meier grafiği



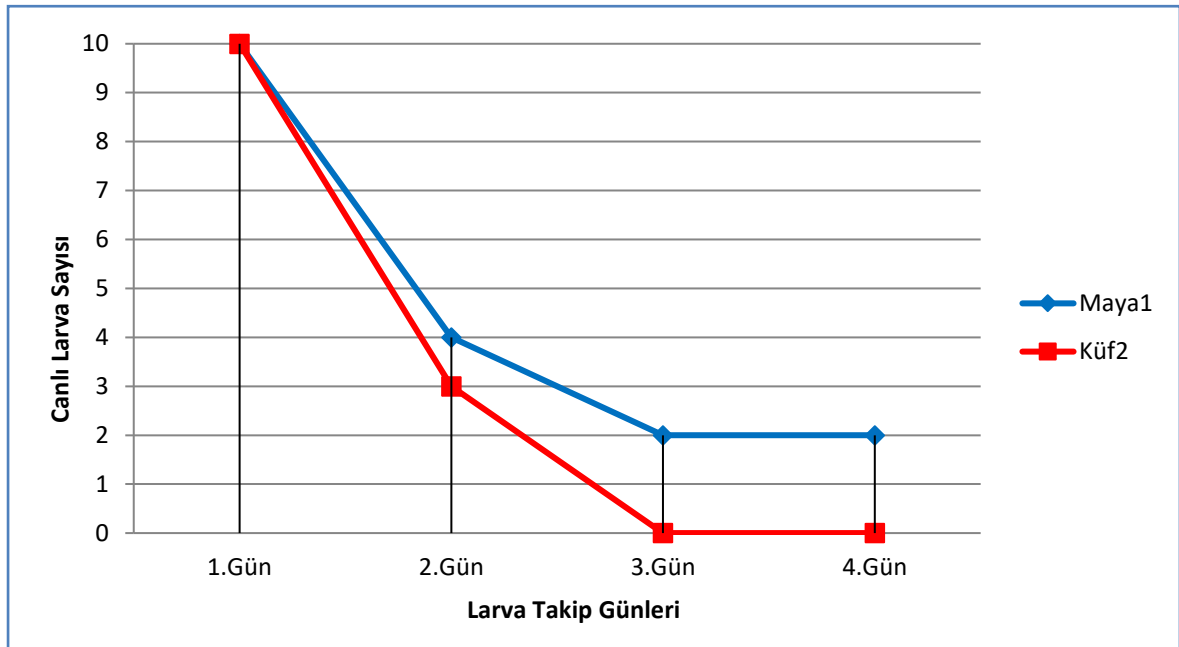
Şekil 4.2. *Mucor circinelloides*'in larvalara enjekte edilen maya formlarının Kaplan-Meier grafiği

Elde edilen verilere göre canlı kalan larvalar esas alınarak Kaplan-Meier grafikleri çizilmiştir.

Her grupta 10 adet larva kullanılmış olup, toplamda 70 larva kullanılmıştır.

Başlangıçta virülansı yüksek seyreden “Küf1” ve “Küf2” iken, sonraki günlerde bu durum değişmiş ve küf ve maya virülansı için benzer durumlar gözlenmiştir.

Bu durum bize küf ve maya formları arasında belirgin bir virülans farkı olmadığını göstermiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *Mucor circinelloides*'in larvalara enjekte edilen “Maya1” ve “Küf2” formlarının Kaplan-Meier grafiği

5. TARTIŞMA

Patojen mantarların bir bölümü dimorfiktir. Dimorfizm, mantarlar için bir virülans faktörüdür. *Candida albicans* için dimorfizm konak-mikroorganizma ilişkisini belirlemektedir. Ancak Mucorales için dimorfizmin virülansa etkisi tam olarak açıklanmamıştır. [50]

Mantarların biyolojisinin ve yaşam tarzının temel özelliği olan küf ve maya dönüşümü enfeksiyonların gelişmesi ve konak savunma sistemlerinin etkisini düşüren virülans faktörlerinin başında gelmektedir. [24]

Yakın zamana kadar anaerobik koşullarda gerçekleşen maya formu ile aerobik hif formu arasındaki dimorfik dönüşümün Mucorales’de virülansla ilişkili olup olmadığı bilinmemektedir. [51]

Fakat son yapılan genomik çalışmalar dimorfizm ve virulans arasındaki ilişkiyi aydınlatmaya başlamıştır. [44]

Organizmanın hangi morfolojiye geçeceğine çevresel faktörler etki etmektedir. Ayrıca karbon kaynağı da çok önemlidir. Fermente edilebilir heksoz şeker varlığında maya formu, karmaşık karbon kaynakları varlığında küf formu gelişmiştir. [52]

Çalışmamızda küf-maya, maya-küf dönüşümünün gösterilmesinde inkübasyon ortamı oldukça önemli olmuştur. Maya formunun 37°C de üremesine dair bulgular olsa da, ekimini gerçekleştirdiğimiz *Mucor circinelloides* oda sıcaklığında hava kısıtlı kapta üremiştir. Anaerobik ortam için kullandığımız anaerobik jar ve “gaspack” ile etüv koşullarında da oda sıcaklığında da üreme gözlenememiştir. Çalışmayı sonlandırmak yerine hava kısıtlı kap tercihimizi değiştirdiğimizde, etüv koşullarında yine üreme olamazken, oda sıcaklığında küf-maya formu dönüşümü gerçekleşmiştir. Aynı şekilde izole ettiğimiz mayadan küf formuna dönüşüm hem etüv hem oda sıcaklığında kolayca gerçekleşmiştir.

Bu durum çevre koşullarındaki değişikliğin *Mucor circinelloides* için ne kadar önemli olduğunu göstermiştir.

Lübbehusen ve arkadaşları (2003), hifal büyüme özelliklerini araştırdıkları çalışmada karbon kaynağı olarak glikoz ve ksiloz birlikte kullanıldığında spesifik hifal büyümenin en yüksek hızda olduğu sonuna varmışlardır. Bu bulgular özellikle *Mucor circinelloides*'in endüstride kullanımını vurgulamaktadır. [52]

Lee ve arkadaşları (2013), bir kalsinörin inhibitörü olan FK506'nın *Mucor* cinsi için hifal büyümeyi önlediğini ortaya koymuştur. Bu sebeple kalsinörin, dimorfik büyümesi olan birçok mantar patojene karşı umut verici bir ilaç hedefidir. [50]

Patojenik mantarlarda kalsinörin morfogenez ve virülansa katılmaktadır. Bu nedenle ilgi çekici bir antifungal ilaç hedefi olarak görülmektedir. Kalsinörin virülanstaki rolü hem insan patojeni mantarlarda hem de bitki patojeni mantarlarda araştırılmıştır. Bununla birlikte kalsinörin *Mucorales*'deki patojenik rolü tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarla kalsinörin inhibitörü olan FK506 ve siklosporin A'nın patojen olan *Mucor*'un büyümesini inhibe ettiğini bulmuşlardır. Anaerobik koşullar altında çok tomurcuklu olarak yetişen *Mucor*, FK506'ya maruz kaldığında aerobik koşullarda bile maya formunda üremektedir. FK506 olmadan aerobik ortamda hifal üreme gelişmektedir. [50]

İzole edilen 8 farklı *Mucor circinelloides* aerobik ortamda YPD agarda FK506 ile inoküle edilmiş ve dört günün sonunda maya formu gözlenmiştir. Maya formu gözlemek için gerekli çevre koşulları (anaerobik/yüksek CO₂) olmamasına rağmen büyümenin gerçekleşmesi FK506'nın küf maya dönüşümünde rol aldığı kanıtı niteliğindedir. [50]

Ayrıca cAMP'ye bağımlı protein kinaz A (PKA), diğer dimorfik mantarlarda olduğu gibi *Mucor* türlerinde de dimorfik geçişe katılmaktadır (*Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* ve *Aspergillus fumigatus*). Mutantların, vahşi kökenlerden daha az virülan olması, küflerin daha virülan olduğunu veya dimorfik gelişimin bu mantarın patojenitesi için önemli olduğunu ortaya koymuştur. Son araştırmalar, kalsinörin hifal polarite gelişimine ve spor boyutu dönüşümünde etkili olduğunu göstermiştir. [51]

Dimorfik dönüşümün moleküler mekanizmaları hakkındaki bilgilerimiz *Saccharomyces cerevisiae*'deki maya ve psöдохifal farklılaşma çalışmalarından elde edilmiştir. Bir dizi homolog sinyal modüllerinin maya ve küf oluşumunu düzenlemede yer aldığına dair kanıtlar ortaya çıkmaktadır. *S.cerevisiae* ve *C.albicans*'taki paralel sinyal iletim yolları, dimorfizme yani cAMP'ye bağlı mitojenle aktive olan protein (MAP) kinaza bağımlı bir yola girmektedir. Ancak farklı mantarlarda, dimorfik kaymanın düzenlenmesinde ve kontrolünde büyük farklılıklar bulunmaktadır. [25]

Mucor cinsi içindeki türlerin maya ve küf gelişimlerinde farklılıklar bulunmaktadır. *Mucor genevensis* yüksek heksoz varlığında aerobik şartlarda maya büyümesi gösterirken, *Mucor rouxii* hem heksoz hem anerobik şartlar istemektedir. *Mucor circinelloides* besiyerinde bir heksoz bulunmadıkça anaerobik ortamda maya olarak gelişmemektedir. [25]

Örneğin dışardan cAMP ilavesi *Candida albicans*'ta hifal gelişimini desteklerken; *Mucor circinelloides*'de maya gelişmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle iki mantarda siklik AMP bağımlı protein kinaz A (PKA)'nın farklı bir işlevi olduğu belirtilmektedir. Yüksek cAMP seviyeleri maya büyümesine yönlendirirken, cAMP seviyelerindeki azalma hifal büyümeye geçişe teşvik etmektedir. [25]

Wolf ve arkadaşları (2002), araştırmalarında *M.circinelloides*'de dimorfizminin mekanizmalarını araştırmaya odaklanmışlardır. Rekombinant proteinlerin üretimi için kontrollü dimorfik değişimden yararlanmışlardır. Bu kontrolü yüksek glikoz seviyeleri ve anerobik ortam koşullarında *Mucor circinelloides*'in maya üremesi göstermesinden sağlamışlardır. [25]

Protein üretimi için küf formunun salgılama kapasitesi önemliyken, biyokütle gelişimi için maya formu önemlidir. [52]

Mucorales hifleri genellikle ağırdır ve daha büyüktür. Ascomycota'daki çaptan daha büyüktür. Hif çapı ve büyüklüğü, makrofajların fagositozunu etkilemektedir. *Rhizopus oryzae* ile yapılan in vitro çalışmalarda biyofilm oluşumu gösterilmiştir. [51]

Li ve arkadaşları (2011), yaptıkları çalışmada *G. mellonella*'da *Mucor circinelloides* ile oluşturdıkları enfeksiyonda virülansı spor boyutu ve çimlenme hızıyla

ilişkilendirmişlerdir. Daha hızlı çimlenme ve daha büyük sporların daha patojenik türlerde olduğunu belirtmişlerdir. [7]

Büyük sporangiyosporlar, küçük olanlardan daha virülandır. Büyük sporlar konakçı bağışıklık hücreleri tarafından fagositozdan hemen sonra istilacı hifal büyümesine başlamakta ve makrofajların ölümüne sebep olmaktadır. Oysa küçük sporlar uzun bir izotropik büyüme periyoduna sahiptir. Bu durum da hifal büyüme formuna geçişi yavaşlatmaktadır. [7]

Yapılan son çalışmalar aslında virülans ve spor büyüklüğü arasındaki bağlantının *Mucor circinelloides* 'te o kadar basit olmadığını göstermiştir.

López-Fernández ve arkadaşları (2018), *Galleria mellonella*'da patojenik kapasitesi doğrulanan avirülan (NRRL3631) ve virülan (CBS2277.49) *M. circinelloides* f. *Lusitanicus*'in iki kökeni arasında genom karşılaştırma çalışmaları yapmışlardır. Hücre dışı proteinler, hücre duvar yapısı ve patojenik potansiyel arasındaki güçlü ilişki göz önüne alınarak, hücre dışı enzimleri kodlayan genlerin incelemesi yapılmıştır. Bu yaklaşım gen eksikliği durumunda patojenik suşun virülans üzerinde etkisinin incelenmesine olanak sağlamıştır. Sporangiyospor boyutunun da karşılaştırması yapılan bu çalışmada CBS2277.49 suşunda küçük ve büyük sporlar farklı çimlenme kinetiği göstermekle beraber, benzer virülans göstermiştir. [44]

Bu sonuçlar, sporangiyospor boyutu ile patojenik kapasite arasında bir ilişki olmadığını ortaya koymuştur. Bu durum çimlenme kinetiğinden ve spor faktörlerinden bağımsız virülans faktörlerinin varlığını (hücre bölünmesi, çeşitli salgılar, metabolizma DNA ve RNA mekanizmaları) ortaya koymuştur. [44]

Her ne kadar patogeneze çok yönlü bir süreç olsa da, bu bulgular *Mucor circinelloides* virülansında salgılanan proteinler ve hücre duvar yüzeyinin kritik rolünü vurgulamaktadır. Kökenler arasındaki hücre duvarı farklılıklarının da anlamlı olduğunu ve araştırmaların devam ettiğini belirtmişlerdir. Avirülan kökünde (NRRL3631genomu) ID112092 geni üzerinde çalışmalara enzimatik aktivitesini ve biyolojik rolünü anlamak için ihtiyaç duyulmaktadır. Bu eşsiz genin fonksiyonel karakterizasyonu, *Mucor circinelloides*'in virülans özelliklerinin ayrıntılandırılmasını sağlayacaktır. [44]

Küçük ve büyük sporlar farklı çimlenme kinetiği gösterebilirler ancak aynı bulaşıcılık durumu mevcuttur. Bulaşıcılık ile sporangiospor büyüklüğü ve patojenik kapasite arasında korelasyon gösterilmemiştir. Spor boyutları ve çimlenme kinetiği ile ilişkili olmayan virulan faktörleri olabileceğini düşündürmektedir. [44]

Çalışmamızda incelediğimiz tür olan, *Mucor circinelloides*'e bağlı enfeksiyonlar ortaya çıktığı zaman genellikle akut ve hızlı ilerleyen bir seyir gösterir. Bağışıklığı baskılanmış hastalarda mukormikoz etkeni olarak tanımlanmıştır. [7]

Patino Medina ve arkadaşları (2017) tarafından *Mucor circinelloides*'de morfogenez ve virülansa katılan ADP-ribozilasyon faktörünü (ARF) kodlayan genler tanımlanmıştır. [53]

Transkripsiyon çalışmaları ARF genlerinin dimorfizminden etkilendiğini ortaya çıkarmıştır. Belirledikleri dört gen grubundan bazılarının işlevlerinin maya büyümesini uyardığını, bazılarının aerobik ortamda büyüme için daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. [53]

Patino Medina ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada *M. circinelloides*'de iki Arl (ARF-benzeri) kodlayıcı gen, arl1 ve arl2 tanımlamıştır. Bunların morfogenez, virülans ve antifungal duyarlılıktaki fonksiyonları araştırılmıştır. [54]

Arl1 ve Arl2 proteinlerinin amino asit dizilerinin %55'i ortaktır. Arl1 ve arl2 genleri farklı transkripsiyonel ekspresyon modelleri göstermiştir. Arl1, arl2'den daha yüksek seviyelerde eksprese edilmiş ve bu veriler Arl1'in morfolojik geçişlerde, hif gelişimi sırasında önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir. [54]

Arl1 ve arl2 genlerinin değişmesi heterokaryon (Δ arl1 (+) (-)) ve homokaryon (Δ arl2) genotiplerine neden olmuştur. Arl1 için homokaryon mutantlarının oluşturulamaması, *M. circinelloides*'in büyümesi için gerekli olduğunu göstermiştir. Her bir genin silinmesi, diğerinin ifadesini düşürmüş ve aralarındaki çapraz ile düzenlemenin varlığını ortaya koymuştur. Arl1 geninin düşük seviyede ifade edilmesi, aerobik büyüme, virülans, ve plazma membran sentez kusurları ilişkili bulunmuştur. [54]

Arl1 ve Arl2 genlerinde işlev bozukluğu, hif üzerindeki veziküllerin yerinin yanlış belirlenmesine neden olmuştur. Her iki gen de *M. circinelloides* vezikül gelişimini ve hücre duvarı kompozisyonunu düzenlemektedir. Arl1 heterokaryonda artan virülansın sorumlu proteinlerin gelecekte tanımlanması ve *M.circinelloides* ile ilgili bilgilerimizi genişletecek ve Mucorales'e karşı yeni antifungaller üretmek için uygun hedeflerin bulunmasını kolaylaştıracaktır. [54]

Trieu ve arkadaşları (2017), Mucorales için RNA tabanlı bir fonksiyonel genomik platform açıklamışlardır. Bu platform virülans, hif morfolojisi, hif ve maya büyümesi aseksüel sporulasyon, karotenoid mekanizması gibi süreçlerin genomik olarak incelenmesini sağlamıştır. [55]

Seçilen bu genler için “knock-out” mutantlar hem *Galleria mellonella* hem de sıçan modelinde gecikmiş çimlenme ve makrofajlar içinde polarize büyüme nedeniyle düşük virülans göstermiştir. mcplD, sporulasyonu azaltıp, β -karoten üretimini arttırmış konak modellerde virülansı azaltmıştır. Bu çalışma Mucorales'de virülansı incelemek için bir yaklaşım sunarken, (mcplD) ve (mycmyo5) olarak tanımlanan iki gen; *Mucor circinelloides*'de gelecekteki antifungal tedaviler için umut verici hedefleri temsil edebilecek yeni virülans belirleyicileri tanımlamamıza olanak sağlayacaktır. [55]

Seksüel üreme, çoğu dimorfik mantarlar için küf formunda meydana gelir. Hayatta kalma ve virülansı arttırmak için gen girişini kolaylaştırmıştır. Termal olarak dimorfik olmayan mantarlarda ise, invazyon için hifal dönüşüm gereklidir. Dimorfizmi yöneten genler bilinmekle birlikte, tüm gen ağının nasıl çalıştığı tam olarak bilinmemektedir. [24]

Candida albicans'ın tomurcuklu maya gelişimi ve hifal dönüşümü arasındaki geçişler, pH, çevresel faktörler ve sıcaklık ile değişmesi, N-asetilglukozamin ve prolin ile uyarılabilir. Bununla birlikte, belki de patojenite için en önemli uyarıcı, hif formunun serum veya makrofajlar tarafından uyarılmasıdır. Bu dimorfizmin kendine özgü biyolojik ilgisine ek olarak, maya ve hifal büyüme arasında dönüşebilme yeteneği *Candida albicans*'ın en önemli virülans özelliklerinden biridir. [56]

Mucor circinelloides maya ve küf formlarının doğrulanması için; aneorbik koşullarda maya formuna dönüşmesi, küf kolonisinin laktofenol pamuk mavisi ile boyanmasının

ardından mikroskopik incelemesinde septasız hifler ve kurdele benzeri katlanmaların gösterilmesi tür tanımını doğrulamıştır.

Aynı şekilde Arroyo ve arkadaşları (2016), yaptıkları çalışmada bağışıklık sistemi baskılanmış bir hastadan alınan örneğin tanımlanması esnasında kültürü yapılan küf kolonisinin laktofenol pamuk mavisi ile boyanması ile dik açılı dallanma, geniş açılı septasız hif gözlenmesi; (25-80) µm ölçülen oval şekilli sporangiyosporları içeren küresel sporangiya, rizoid ve stolon olmaması ve izolatin anaerobik koşullar altında maya formuna dönüşebilme kabiliyeti ve 42°C de büyümesi ile izolatin *Mucor circinelloides* olduğunu kanıtlamışlardır. [37]

FK506 ile tedavi edilen hastalarda mukormikoz gelişmemesi ve kalsinorin inhibitörlerinin virülansı hafifletmesi örtüşmektedir. [24]

Halen, *Mucor*'da bu hipotezleri daha ileri düzeyde test etmek için kullanılabilecek hif yapamayan “knock-out” mutantlar mevcut değildir. Bu gözlem genel olarak önce iki önemli sonucu destekler, dimorfizm bu mantar türündeki virulansla bağlantılıdır ve ikincisi kalsinörin inhibitörleri mukormikozu kontrol etmenin etkili yolu olabilir. [50]

Konağın sahip olduğu ve hastalığa zemin hazırlayan risk faktörlerine göre hastalığın belli klinik formlarına yatkınlık artar. Diyabetli hastalarda en sık rinoserebral form görülür. Diyabetli hastalarda mukormikoza karşı artmış eğilimde glutatyon mekanizmasında bozukluk, azalmış nötrofil kemotaksisi ve fagositik aktivite rol oynar. Ayrıca diyabetli hastalarda görülen asidoz, transferrinin demir bağlama kapasitesinin azalmasına ve serbest demir miktarının artmasına yol açar. Ortamdaki mantarlar da bağlanmamış demiri daha kolay kullanıp daha çabuk ürerler. Mantar sayısı çoğaldıkça anjiyoinvaziv olan bu mantarlar damar invazyonu yaparak iskemi ve asidozu artırıp kısır döngü oluşturur. [57]

Mueller ve arkadaşları (2019), çalışmalarında açılmamış bir yoğurttan izole ettikleri *Mucor* kökenini kemirgen bir konak modelinde incelemişlerdir. *Mucor* sporlarına maruz bırakılan farelerin dışkı örneklerinden elde edilen DNA ile mikrobiyota analizi yapılmıştır. Elde edilen bakteriyel 16S rRNA geni ve elde edilen mantar ITS1 dizileri, her taksonu tanımlamak için kullanılmıştır. Regresyon analizi ile *Mucor*'u yutan farelerin gastrointestinal kanallarında bakteri ve mantar değişiklikleri olduğunu ortaya koymuştur.

Ayrıca, farelerde *Bacteroides* ve *Akkermansia muciniphila* azalmıştır. Fare grupları arasında bakteri ve mantar taksonu seviyelerinde kaymalar göstermektedir. Bu bulgular, gastrointestinal sistemin *Mucor*'a maruz kalmasının mikrobiyotayı değiştirebileceğini ve daha da önemlisi bağırsak mikrobiyotası ile bakteriyota arasındaki etkileşimi göstermektedir. *Mucor*, kararsız bağırsak bariyerlerinin göstergesi olabilecek epitel hücre tabakalarında geçirgenliğin artmasına neden olmuştur. Bu çalışmalar mantar mikrobiyotasının insanlardaki bağırsak bozukluklarında nasıl rol oynayabileceğini gösterebilecektir. [58]

Biyopsi örneklerinin mikroskopisinde organizmalar geniş düzensiz duvarlar ve az veya çok dik açılı dallanmalara sahip septasız hifalar halinde görünür. [59]

Çoğu zigomikoz vaka bildiriminde hastalığın türlerle ilişkilendirilmesi zor olmaktadır. Tür seviyesine göre tayin edilmesi sadece morfolojik olarak değil çeşitli DNA dizi analizlerinin yapılmasının ardından netlik kazanmaktadır. Böylece yapılan çalışmalarda ve olgu raporlarında lipozomal amfoterisin B ve cerrahi debriman ile hastalığın seyrine iyi yönde etki edildiği bu sayede tedavinin olumlu sonuçlandığı bildirilmektedir. [6,38]

Çalışmamızda *Mucor circinelloides*'in maya ve küf formlarının *Galleria mellonella* larvalarına enjekte edilerek hangi formun daha virülan olduğunun incelemesi yapılmıştır. Virülans deneyinin sonucunda belirgin bir fark olmadığı ortaya konulmuştur.

Mucor circinelloides'in virülans özellikleri *Candida albicans* kadar ayrıntılı çalışılmamıştır. Bu sebeple *Candida albicans*'ın virülans özellikleri referans alınarak açıklamalar yapılmıştır. Son yıllarda artan olgu sunumları ve endüstriyel üretimi sayesinde ilgi odağı olan *Mucor circinelloides* için araştırmalar devam etmektedir.

Virülans faktörlerinde en önemli rolü hücre duvar, hücre zarı ve hücre dışı enzimler kapsamaktadır. Adezyon, proteinaz, fosfolipaz, slaym faktör, germ tüp-hif oluşturma (dimorfizm), toksinler, fenotipik değişim, ve hücre yüzeyi virülansı patogeneizde rol oynar. Yüzeysel enfeksiyonlar ile invaziv enfeksiyonlar için tek bir virülans faktörü etkili değildir. Bu faktörler türlere göre değişmektedir. [34]

Ibrahim ve arkadaşları (2013), çalışmalarında *Mucor circinelloides*'in virülansındaki demir alımı üzerine yoğunlaşmışlardır. Ek olarak, doku yayılımı sürecine katılan konakçı reseptörler ve mantar ligantları, ayrıca sporangiyospor büyüklüğü ve eşey lokusları ve bunların Mucorales'in tepkilerine katkıları incelenmiştir. [60]

Sideroforların salgıladıkları düşük molekülü Fe taşıyıcıları ortamdaki demiri aktif olarak içlerine aktarır. Siderofor varlığı, redüktaz/permeaz enzimlerinin işlevi, konak hücre reseptörü (GRP78) ve konak savunmasında rol oynayan NK hücreleri ile Mucorales'e özgü T hücrelerinin virülanstaki rolü kanıtlanmıştır. [60]

Mucorales'de eşey lokusu yüksek hareketli bir gruptan (HMG) oluşur ve RNA helikaz ve trioz fosfat homologunu taşıyıcı genlerle çevrilidir. HMG proteinleri SexP (+) ve SexM(-) çiftleşme tipleri (MAT) bulundurur. *M. circinelloides f. Lusitanicus* ile yapılan çalışmada (-) ve (+) MAT izolatları arasında spor boyutunun ve şeklinin farklılık gösterdiği (-) kökenlerin daha büyük, düzensiz şekilli sporlar oluştururken (+) suların daha küçük sporlar ürettiği gösterilmiştir. Daha büyük sporların *Galleria mellonella* modelinde daha küçük sporlara kıyasla kısa zamanda geliştiği ve makrofajların lizisine yol açtığı gözlemlenmiştir. Demirin virülanstaki rolü ise mukormikozun patogeneğinde koşullu inaktivasyonun ortaya çıkmasıyla açıklanmaktadır. *R. oryzae*'nin yüksek afiniteli demir geçirgenlik geni FTR1, içinde mantarı patojenik olmayan hale getirir. Demir varlığının bulunmaması mikroorganizmaların yüzey kompozisyonları üzerine etki ederek mikroorganizmanın antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılığını değiştirmektedir. [60]

Adezyon ve invazyon fungal hücrelerin endotelyum kan damarları ile etkileşimi hastalığın ilerlemesinde önemlidir. Mucorales, endotel hücrelerine in vitro yapışarak istila edebilir ve hasar verebilmektedir. Mucorales ile insan endotel hücreleri arasındaki etkileşimleri araştıranlar, seçici bir konak reseptörünün doku hasarına sebep olduğunu bildirmişlerdir. [60]

Yakın zamanda Mucorales'de bulunan ve diğer patojenlerde bulunmayan CotH proteinlerinin endotel hücrelerinin istilası sırasında GRP78'e bağlanan fungal ligandlar olarak işlev gördüğü, bildirilmiştir. Mucorales'de CotH'ın eşsiz varlığı DKA hastalarının mukormikoz duyarlılığını açıklamaktadır. Dahası CotH ile GRP78 etkileşimi mukormikoz için umut verici bir tedavi hedefi olmuştur. [60]

Yakın zamana kadar, kazanılmış bağışıklığın mukormikozda rolü önemsiz kabul edilmekteydi. Çünkü kazanılmış T-hücresi eksikliği *Mucorales* enfeksiyonlarına duyarlılığın artmasıyla ilişkili değildir. Fakat son çalışmalar, hastalarda ve sağlıklı bireylerde *Mucorales*'e özgü T-hücrelerinin varlığını belirtmişlerdir. Bu da fagositlerin fonksiyonunu etkileyerek; tanı ve immunoterapi stratejilerinin oluşturulmasını sağlayacaktır. [60]

Doğal öldürücü (NK) hücreleri ile yapılan çalışmalarda, hif formunun immünosupresif etkisine rağmen doğal immünite hücreleri fungal hiflere doğrudan zarar vermektedir. [60]

Her ne kadar olası virülans özelliklerinin hepsi araştırma için çekici olsa da, esasen yeni tedaviler ve tanı yöntemleri daha ilginç araştırmalardır (Çizelge 5.1). [60]

Çizelge 5.1. *Mucorales*'in virülans özellikleri ve bunların mukormikoz için tanı ve tedavi geliştirilmesi olasılıkları [60]

Virülans özellikleri	İşlev	Virülanstaki rolü/immünopatogenezi	Tanı potansiyeli	Tedavi potansiyeli
Demir alımı				
Redüktaz/permeaz	Tükenmiş demir ortamlarında demir alımı	Kanıtlanmış		
Permeaz (FTR1)		Kanıtlanmış	Belirlenmemiş	
Redüktazlar		Varsayılan	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
Bakır-oksidadazlar		Varsayılan	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
Siderofor	Siderofor aracılı demir alımı	Kanıtlanmış		
Rizoferrin		Varsayılan	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
Deferoksamin		Kanıtlanmış	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
Hemi oksijenaz	Hemi oksijenaz aracılı demir alımı	Varsayılan	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
CotH	Konak hücre istilası	Kanıtlanmış		
GRP78	Konak hücre reseptörü	Kanıtlanmış	Belirlenmemiş	
Proteinazlar	Protein lizisi	Varsayılan	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
Kitin/kitosan	Hücre yapı taşı	Varsayılan	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
Ergosterol biyosentezi	Hücre zarı akışkanlığı ve azol direnci	Varsayılan	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
Hücre boyutu		Kanıtlanmış	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
Eşey lokusu	Çiftleşme	Varsayılan	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
NK hücreleri	Konak savunması	Kanıtlanmış	Belirlenmemiş	
<i>Mucorales</i> 'e özgü T hücreleri	Konak savunması	Kanıtlanmış		

6. SONUÇ

Çalışmamıza anabilim dalı laboratuvarımızda bulunan *Mucor circinelloides* kökenleri canlandırılarak başlanmıştır. -80°C’de bulunan bu kökenler SDA’a ekilerek 24-48 saatlik inkübasyon sonunda koloniler elde edilmiştir.

Mucor circinelloides’in maya ve küf formunun elde edilmesi amaçlanmış ardından maya-küf / küf-maya dönüşümleri gösterilerek hangi morfolojik formun daha virülan olduğunu göstermek için mum güvesi olarak bilinen *Galleria mellonella* larvalarına maya ve küf süspansiyonlarından 10 µl Hamilton iğnesi yardımıyla sol arka ayak hizasından enjekte edilmiştir. Canlı kalan larvalar 4 gün süresince not edilmiş ve bu sonuca göre Kaplan-Meier grafikleri oluşturulmuştur.

Galleria mellonella gibi omurgasız canlıların, mikroorganizmaların virölansının ve konak cevabının araştırılmasında kullanılması, bu canlıların ekonomik olmaları, etik kurul onayı gerektirmemeleri ve kolayca uygulama yapılabilimleri sebebiyle avantajlıdır.

Elde ettiğimiz deney sonuçları aşağıda özetlenmektedir.

Mucor circinelloides kültür koşullarına göre çeşitli morfolojik özellikler sergileyen bir mikroorganizma olduğu için küf ve maya formlarının oluşturulması için uygun şartlar belirlenmiştir.

Oksijene bağlı dimorfizm gösteren bu mantarın maya formunun elde edilmesi için anaerobik ortam koşulları (25±2)°C oda sıcaklığı hazırlanmıştır ve 96 saat sonunda istenilen küf-maya dönüşümü gerçekleştirilmiştir.

Bunun için öncelikle anaerobik jar kullanılmış, üreme olmayınca, aynı koşullar altında farklı bir hava kısıtlı kap kullanılarak SDA’a ekimi yapılan küf formunun maya formuna dönüşümü gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda maya dönüşümü için etüv koşulları 37°C uygun olmamış, oda sıcaklığında üreme gösterilmiştir. Oda sıcaklığında üreme göstermiştir.

Elde ettiğimiz maya formundan aldığımız örneğin, aerobik ortam koşullarında SDA'a ekimi yapılmıştır. $(25\pm2)^{\circ}\text{C}$ 'de oda sıcaklığında ve 37°C 'de etüvde inkübe edildikten sonra maya-küf dönüşümü gözlemlenmiştir. Bu dönüşüm ortalama 24-48 içerisinde gerçekleşmiştir.

Mucor circinelloides'in özellikle küf-maya dönüşümü için uzun inkübasyon süresi gerektiren bir mantar olduğu anlaşılmıştır.

İzole ettiğimiz maya ve küf formunun direkt mikroskopik incelemelerle ve türe özgü yapıları *Mucor circinelloides* olduğunu doğrulamıştır.

Küf ve maya arasındaki virülans farkının gösterilmesi için kullandığımız *Galleria mellonella* larvalarına yaptığımız enjeksiyon sonuçları değerlendirilmiştir. Larvaları öldürme güçleri ve hızları üzerinden sonuçları incelediğimizde *Mucor circinelloides*'in larvalar için virülan olduğu, fakat küf ve maya arasında belirgin bir virülans farkı olmadığı sonucu çıkarılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Kibbler, C. C., Barton, R., Gow, N. A. R., Howell, S., MacCallum, D. M. and Manuel, R. J. (Editörler). (2018). *Medical Mycology*, Great Britain: Oxford University Press, 10.
2. Vellanki, S., Navarro-Mendoza, M. I., Garcia, A., Murcia, L., Perez-Arques, C., Garre, V., Nicolas, F. E. and Lee, S. C. (2018). *Mucor circinelloides*: Growth, maintenance, and genetic manipulation. *Current Protocols in Microbiology*, 49 (1), e53
3. Aytuna H. (2004). *Katı faz fermentasyon yöntemiyle küflerden lipid üretimi*. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
4. Zhang, Y., Luan, X., Zhang, H., Garre, V., Song, Y. and Ratledge, C. (2017). Improved γ -linolenic acid production in *Mucor circinelloides* by homologous overexpressing of delta-12 and delta-6 desaturases. *Microbial Cell Factories*, 16 (1), 113.
5. Vicente, G., Bautista, L.F., Rodríguez, R, Gutiérrez, F.J., Sádaba, I., Ruiz-Vázquez, R.M., Torres-Martínez, S. and Garre, V. (2009). Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochemical Engineering Journal*, 48, 22-27.
6. Iwen, P. C., Sigler, L., Noel, R. K. and Freifeld, A. G. (2007). *Mucor circinelloides* was identified by molecular methods as a cause of primary cutaneous zygomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (2), 636-640.
7. Li, C. H., Cervantes, M., Springer, D.J., Boekhout, T., Ruiz-Vazquez, R. M., Torres-Martinez, S. R., Heitman, J. and Lee, S. C. (2011). Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathogens*, 7 (6), e1002086.
8. Lübbehüsen, T., Polo, V. G., Rossi, S., Nielsen, J., Moreno, S., McIntyre, M. and Arnau, J. (2004). Protein kinase A is involved in the control of morphology and branching during aerobic growth of *Mucor circinelloides*. *Microbiology*, 150 (Pt 1), 143-150.
9. Yücel, A. (1999). Medical mycology: Yesterday and today. *Cerrahpasa Journal of Medicine*, 30 (2), 191-198.
10. Brooks, G. F., Carrol, K. C., Butel, J. S., Morse, S. and Mietzner, T. A. (2015). *Tıbbi Mikrobiyoloji* (Çev. Prof. Dr. Osman Şadi Yenen). İstanbul: Nobel Tıp Yayınevi. (Eserin orijinali 1976'da yayımlandı), 672-676.
11. Lübbehüsen, T.L., Nielsen, J. and McIntyre, M. (2003). Morphology and physiology of the dimorphic fungus *Mucor circinelloides* (syn. *M. racemosus*) during anaerobic growth. *Micological Research*, 107 (2), 223-230.

12. Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T. Y., O'Donnell, K., Roberson, R. W., Taylor, T. N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M. M. and Stajich, J. E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108 (5), 1028-1046.
13. Chang, Y., Desirò, A., Na, H., Sandor, L., Lipzen, A., Clum, A., Barry, K., Grigoriev, I. V., Martin, F. M., Stajich, J. E., Smith, M. E., Bonito, G. and Spatafora, J. W. (2019). Phylogenomics of endogonaceae and evolution of mycorrhizas within mucoromycota. *The New Phytologist*, 222 (1), 511-525.
14. Campbell, N. A. and Reece, J. B. (2008). *Biyoloji* (Çev. Ertunç Gündüz, Ali Demirsoy ve İsmail Türkan). Ankara: Palme Yayıncılık (Eserin orijinali 2001'de yayımlandı), 618.
15. Grolig, F., Herkenrath, H., Pumm, T., Gross, A. and Galland, P. (2004). Gravity susception by buoyancy: floating lipid globules in sporangiophores of phycomyces. *Planta*, 218 (4), 658-667.
16. Gooday, G. W. and Carlile, M. J. (1997). The discovery of fungal sex hormones: III. Trisporic acid and its precursors. *Mycologist*, 11 (3), 126-130.
17. Schultze, K., Schimek, C., Wöstemeyer, J. and Burmester, A. (2005). Sexuality and parasitism share common regulatory pathways in the fungus *Parasitella parasitica*. *Gene*, 28 (348), 33-44.
18. Watkinson, S. C., Boddy, L. and Money, N. P. (2015). *The Fungi* (3rd edition). Waltham: Academic Press, 268-269.
19. Şenol, E. (2008). Zigomikozis. *Flora*, 13 (1), 5-12.
20. Carris, L. M., Little, C. R. and Stiles, C. M. (2012). Introduction to fungi. *The Plant Health Instructor*, DOI: 10.1094/PHI-I-2012-0426-01.
21. Hoffmann, K., Pawłowska, J., Walther, G., Wrzosek, M., de Hoog, G. S., Benny, G. L., Kirk, P. M. and Voigt, K. (2013). The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia*, 30, 57-76.
22. Murray, P. R. (2018). *Temel Tıbbi Mikrobiyoloji* (Çev. A. Dürdal Us ve Ahmet Baş Ustaoglu). Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri (Eserin orijinali 2016'da yayımlandı), 127.
23. Aliyeva, Z., Erdem, H., Karakuş, A. K. ve Kalkanci, A. (2017). Klinik örneklerden ve havadan izole edilen küf mantarlarının in vitro virülans faktörlerinin ve *Galleria mellonella* larva ölüm hızlarının karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 47 (2), 67-77.
24. Gauthier, G. M. (2015). Dimorphism in fungal pathogens of mammals, plants, and insects. *PLoS Pathogens*, 11 (2), e1004608

25. Wolff, A. M., Appel, K. F., Petersen, J. B., Poulsen, U. and Arnau, J. (2002). Identification and analysis of genes involved in the control of dimorphism in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*). *FEMS Yeast Research*, 2 (2), 203-213.
26. Valle-Maldonado, M. I., Jácome-Galarza, I. E., Gutiérrez-Corona, F., Ramírez-Díaz, M. I., Campos-García, J. and Meza-Carmen, V. (2015). Selection of reference genes for quantitative real time RT-PCR during dimorphism in the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Molecular Biology Reports*, 42 (3), 705-711.
27. Boyce, K. J. and Andrianopoulos, A. (2015). Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. *FEMS Microbiology Reviews*, 39 (6), 797-811.
28. Mayer, F. L., Wilson, D. and Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4 (2), 119-128.
29. Gauthier, G. M. (2017). Fungal dimorphism and virulence: Molecular mechanisms for temperature adaptation, immune evasion, and in vivo survival. *Mediators of Inflammation*, 2017, 8491383.
30. Orlowski, M. (1991). *Mucor* dimorphism. *Microbiological Reviews*, 55 (2), 234-258.
31. Seyedmousavi, S., İlkit, M., Durdu, M., Ergin, Ç., Hilmioğlu-Polat, S., Melchers, W. ve Verweij, P. (2015). *Candida* ve kandidoz: Epidemiyoloji, tanı, tedavi, antifungal ilaç direnci ve konağın genetik yatkınlığı güncel durum. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 45 (1), 1-11.
32. Arslan, A. (2007). *Candida türlerinde subinhibitör konsantrasyonda antifungal ilaç uygulamalarının slime faktör oluşumuna etkileri*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.
33. Samasti, M., Kiraz, N. ve Aygün, G. (2011). *Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ders Kitabı* (Cilt 1). İstanbul: İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi, 564-565.
34. Çerikçioğlu, N. (2012). Mantarlarda virülans faktörleri. *Ankem Dergisi*, 26 (Ek 2), 261-269.
35. Jabra-Rizk, M. A., Kong, E. F., Tsui, C., Nguyen, M. H., Clancy, C. J., Fidel, P. L. Jr. and Noverr, M. (2016). *Candida albicans* pathogenesis: Fitting within the host-microbe damage response framework. *Infection and Immunity*, 84 (10), 2724-2739.
36. Lepak, A. J., and Andes, D. R. (2014). Antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5 (5), a019653.
37. Arroyo, M. A., Schmitt, B. H., Davis, T. E. and Relich R. F. (2016). Detection of the dimorphic phases of *Mucor circinelloides* in blood cultures from an immunosuppressed female. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2016, 3720549.
38. Chandra, S. and Woodgyer, A. (2002). Primary cutaneous zygomycosis due to *Mucor*

- circinelloides*. *Australasian Journal of Dermatology*, 43 (1), 39-42.
39. Spellberg, B., Edwards, J. Jr. and Ibrahim A. (2005). Novel perspectives on mucormycosis: pathophysiology, presentation, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 18 (3), 556-569.
 40. İnternet: *Mucor circinelloides*. *Genome*. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fgenome.jgi.doe.gov%2FMucci2%2FMucci2.home.html&date=2019-05-20>, Son Erişim Tarihi: 20.05.2019.
 41. Csernetics, A., Nagy, G., Iturriaga, E. A., Szekeres, A., Eslava, A. P., Vágvölgyi, C. and Papp, T. (2011). Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Fungal Genetics and Biology*, 48 (7), 696-703.
 42. Papp, T., Velayos, A., Bartók, T., Eslava, A. P., Vágvölgyi, C. and Iturriaga, E. A. (2006). Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69 (5), 526-531.
 43. Papanikolaou, S. and Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113 (8), 1031-1051.
 44. López-Fernández, L., Sanchis, M., Navarro-Rodríguez, P., Nicolás, F. E., Silva-Franco, F., Guarro, J., Garre, V., Navarro-Mendoza, M. I., Pérez-Arques, C. and Capilla, J. (2018)., Understanding *Mucor circinelloides* pathogenesis by comparative genomics and phenotypical studies. *Virulence*, 9 (1), 707-720.
 45. Dizbay, M., Adisen, E., Kustimur, S., Sari, N., Cengiz, B., Yalcin, B., Kalkanci, A., Gonul, I. I. and Sugita, T. (2009). Fungemia and cutaneous zygomycosis due to *Mucor circinelloides* in an intensive care unit patient: Case report and review of literature. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 62 (2), 146-148.
 46. Upadhyay, V., Kumar, A., Singh, A. K. and Pandey, J. (2019). Epidemiological characterization of dermatophytes at a tertiary care hospital in Eastern Uttar Pradesh, India. *Current Medical Mycology*, 5 (1), 1-6.
 47. Arslan, U. (2003). *Klinik örneklerden izole edilen Candida albicans türü maya mantarında virülans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in-vitro araştırılması*. Yayınlanmamış Uzmanlık Tezi, Selçuk Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.
 48. Kalkancı, A., Fouad, A. A., Erdoğan, M., Altay, A., Aliyeva, Z., Bozdayı, G. ve Çağlar, K. (2015). Bazı bakteri ve mantarların virülansının araştırılmasında *Galleria mellonella*'nın in vivo model olarak kullanılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 49 (3), 366-376.
 49. Fuchs, B. B., Eby, J., Nobile, C. J., El Khoury, J. B., Mitchell, A. P., and Mylonakis, E. (2010). Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*.

Microbes and Infection, 12 (6), 488-496.

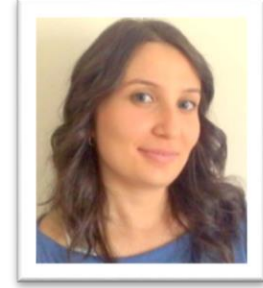
50. Lee, S. C., Li, A., Calo, S. and Heitman, J. (2013). Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathogens*, 9 (9), e1003625.
51. Muszewska, A., Pawłowska, J. and Krzyściak, P. (2014). Biology, systematics, and clinical manifestations of Zygomycota infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33 (8), 1273-1287.
52. Lübbehüsen, T. L., Nielsen, J. and McIntyre, M. (2003). Characterization of the *Mucor circinelloides* life cycle by on-line image analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 95 (5), 1152-1160.
53. Patiño-Medina, J. A., Maldonado-Herrera, G., Pérez-Arques, C., Alejandre-Castañeda, V., Reyes-Mares, N. Y., Valle-Maldonado, M. I., Campos-García, J., Ortiz-Alvarado, R., Jácome-Galarza, I. E., Ramírez-Díaz, M. I., Garre, V. and Meza-Carmen, V. (2017). Control of morphology and virulence by ADP-ribosylation factors (Arf) in *Mucor circinelloides*. *Current Genetics*, 64 (4), 853-869.
54. Patiño-Medina, J. A., Valle-Maldonado, M. I., Maldonado-Herrera, G., Pérez-Arques, C., Jácome-Galarza, I. E., Díaz-Pérez, C., Díaz-Pérez, A. L., Araiza-Cervantes, C. A., Villagomez-Castro, J. C., Campos-García, J., Ramírez-Díaz, M. I., Garre, V. and Meza-Carmen, V. (2019). Role of Arf-like proteins (Arl1 and Arl2) of *Mucor circinelloides* in virulence and antifungal susceptibility. *Fungal Genetics and Biology*, 129, 40-51.
55. Trieu, T. A., Navarro-Mendoza, M. I., Pérez-Arques, C., Sanchis, M., Capilla, J., Navarro-Rodriguez, P., Lopez-Fernandez, L., Torres-Martínez, S., Garre, V., Ruiz-Vázquez, R. M. and Nicolás, F. E. (2017). RNAi-based functional genomics identifies new virulence determinants in mucormycosis. *PLoS Pathogens*, 13 (1), e1006150.
56. Molero, G., Díez-Orejas, R., Navarro-García, F., Monteoliva, L., Pla, J., Gil, C., Sánchez-Pérez, M. and Nombela, C. (1998). *Candida albicans*: Genetics, dimorphism and pathogenicity. *International Microbiololy*, 1 (2), 95-106.
57. Dirim, A. B., Zorlutuna Kaymak, N., Gürsel Özkurt, Z., Demir, M. ve Tiryaki Demir, S. (2014). Rinoorbitoserebral mukormikoz. *Türkiye Klinikleri Journal of Ophthalmology*, 23 (1), 60-66.
58. Mueller, K. D., Zhang, H., Serrano, C. R., Billmyre, R. B., Huh, E. Y., Wiemann, P., Keller, N. P., Wang, Y., Heitman, J. and Lee, S. C. (2019). Gastrointestinal microbiota alteration induced by *Mucor circinelloides* in a murine model. *Journal of Microbiology*, 57 (6), 509-520.
59. Levinson, W. (2008). *Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji* (Çev. Tuncay Özgünen). (Dokuzuncu Baskı). Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri (Eserin orijinali 2006'da yayımlandı), 334-349.

60. Ibrahim, A. S., Kontoyiannis, D. P. (2013). Update on mucormycosis pathogenesis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 26 (6), 508-515.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KARAKURT Funda
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 24.06.1989
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0535 888 65 14
 e-mail : fnddmr@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Tıbbi Mikrobiyoloji A.D	Devam ediyor
Lisans	Hacettepe Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Başkent Lisesi (YDA)	2007

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Bilgihan, K., Kalkancı, A., Ozdemir, H. B., Yazar, R., Karakurt, F., Yuksel, E., Otag, F., Karabicak, N. and Arikan-Akdagli, S. (2016). Evaluation of antifungal efficacy of 0.1% and 0.25% riboflavin with UVA: A comparative in vitro study. *Current Eye Research*, 41 (8), 1050-1056.
2. Özdemir, H. B., Kalkancı, A., Bilgihan, K., Göçün, P. U., Ögüt, B., Karakurt, F. and Erdoğan, M. (2019). Comparison of corneal collagen cross-linking (PACK-CXL) and voriconazole treatments in experimental fungal keratitis. *Acta Ophthalmologica*, 97 (1), e91-e96.

3. Kalkanci, A., Bilgihan, K., Ozdemir, H. B., Yar Saglam, A. S., Karakurt, F. ve Erdogan, M. (2018). Corneal cross-linking has no effect on matrix metalloproteinase 9 and 13 levels during fungal keratitis on the early stage. *Mycopathologia*, 183 (2), 329-336.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

