



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

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**SODYUM HİPOKLORİT, BENZALKONYUM KLORİT VE
KLORHEKZİDİN İLE KARŞILAŞMIŞ
CANDIDA ALBICANS KÖKENLERİNDE
HÜCRESEL DEĞİŞİKLİKLERİN AFM İLE İNCELENMESİ**

MERVE ERDOĞAN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2016



**SODYUM HİPOKLORİT, BENZALKONYUM KLORİT VE
KLORHEKZİDİN İLE KARŞILAŞMIŞ *CANDIDA ALBICANS*
KÖKENLERİNDE HÜCRESEL DEĞİŞİKLİKLERİN AFM İLE
İNCELENMESİ**

Merve ERDOĞAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

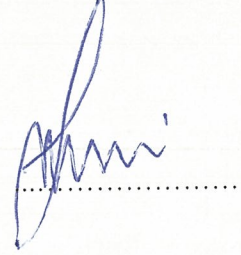
HAZİRAN 2016

Merve ERDOĞAN tarafından hazırlanan “SODYUM HİPOKLORİT, BENZALKONYUM KLOORİT VE KLOORHEKZİDİN İLE KARŞILAŞMIŞ *CANDIDA ALBICANS* KÖKENLERİNDE HÜCRESEL DEĞİŞİKLİKLERİN AFM İLE İNCELENMESİ” 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

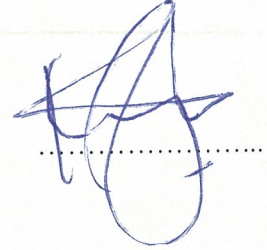
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Başkan : Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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



Üye : Prof. Dr. Aydın KARAARSLAN

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

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



Tez Savunma Tarihi: 20 /06 /2016

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

Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık 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.

Merve Erdoğan

20/06/2016

SODYUM HİPOKLORİT, BENZALKONYUM KLORİT VE KLORHEKZİDİN İLE
KARŞILAŞMIŞ *CANDIDA ALBICANS* KÖKENLERİNDE HÜCRESEL
DEĞİŞİKLİKLERİN AFM İLE İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Merve ERDOĞAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2016

ÖZET

Dezenfeksiyon ve sterilizasyon nozokomiyal infeksiyonların önlenmesinde çok önemlidir. Fırsatçı patojen *Candida albicans*, hastane kaynaklı mantar infeksiyonlarında morbidite ve mortalitenin temel sebebidir. Sodyum hipoklorit (SHC), benzalkonyum klorit (BNZ) ve klorhekzidin (CHX) hastanelerde yaygın olarak kullanılan biyosidlerdir. Biyosidlerin mantara karşı etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), mikrobiyolojik araştırmalarda güçlü bir yüzey görüntüleme aracıdır. Bu çalışmanın amacı, biyosidlerin referans köken *Candida albicans* ATCC 10231 üzerinde morfolojik etkilerinin araştırılmasıdır. Biyosidlerin Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) ve Minimum Fungisidal Konsantrasyon (MFK) değerleri mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. *Candida albicans* farklı konsantrasyonlarda ve belirli sürelerde biyoside maruz bırakılmış ve atomik kuvvet mikroskobu ile gözlemlenmiştir. CHX ve BNZ muamelesi, *Candida albicans* yüzeyinde deformasyon, kabarcık ve por oluşumu, olukların genişlemesi gibi etkilere neden olmuştur. Uzun süreli temas ve yüksek konsantrasyonda, biyosidlerin hücreleri parçalayarak zarar verdiği gösterilmiştir. SHC, tüm konsantrasyon ve zaman dilimlerinde hücre lizisine neden olmuştur. Pürüzlülük, biyoside maruz bırakılmış hücrelerde negatif hücrelerden daha fazladır. Biyosidlerin mantara karşı gösterdikleri antimikrobiyal aktivite belirlenmiş ve hücre yüzeyinde meydana gelen tüm morfolojik değişimler biyosidal aktivite nedeniyle membran geçirgenliğinin artmasına bağlanmıştır. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma *Candida albicans* üzerine biyosidlerin direk etkisini, AFM ile morfolojik modifikasyonları üç boyutlu görüntüleyerek ve yükseklik, pürüzlülük gibi hücresel özellikleri nanometre boyutunda ölçerek gösteren ilk çalışmadır.

Bilim Kodu : 1039.4.101
Anahtar Kelimeler : *Candida albicans*, biyosid, AFM
Sayfa Adedi : 70
Danışman : Prof. Dr. Ayşe KALKANCI

MORPHOLOGY OF *CANDIDA ALBICANS* EXPOSED TO SODIUM
HYPOCHLORIDE, BENZALKONIUM CHLORIDE AND CHLORHEXIDINE UNDER
ATOMIC FORCE MICROSCOPY (AFM)

(M. Sc. Thesis)

Merve ERDOĞAN

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

June 2016

ABSTRACT

Disinfection and sterilization procedures are important to prevent nosocomial infections. Opportunistic pathogen *Candida albicans* is the major cause of morbidity and mortality in nosocomial fungal infections. Sodium hypochloride, benzalkonium chloride and chlorhexidine are biocides that are widely used in hospital setting. Mechanisms of action of biocides against fungi are not known exactly. Nowadays, Atomic Force Microscopy (AFM) has become an powerful surface imaging tool in microbiological research. The aim of this study to investigate the morphological effects of biocides in reference strain *Candida albicans* ATCC 10231. Minimum Inhibitory Concentrations and Minimum Fungicidal Concentrations of biocides were assessed by using microdilution method. *Candida albicans* exposed to different concentrations of biocides at specific time points and imaged by using AFM. CHX and BNZ treatment was caused the effects such as deformation, bubble formation, perforation and expansion of holes on surface of the cells and long-term contact with biocides has been shown to damage by lysis of cells at high concentrations. In all concentrations and time points, SHC caused cell lysis. Roughness was higher in biocide treated cells than negative control cells. Antimicrobial activity of biocides against fungi was determined and all morphological changes that occurred on the cell surface were found to be linked to increase in membrane permeability due to the biocidal activity. According to our knowledge this is the first study demonstrating the direct effects of biocides on *Candida albicans* by three dimensional imaging the morphological modifications and measuring cellular properties as height, roughness at nanometer scale by using AFM.

Science Code : 1039.4.101
Key Words : *Candida albicans*, biocide, AFM
Page Number : 70
Advisor : Prof. Dr. Ayşe KALKANCI

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden beri bilgi ve donanımı ile beni yetiştiren, rehberlik eden değerli danışman hocam Prof. Dr. Ayşe KALKANCI' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana emeği geçen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli tüm öğretim üyelerine, tez değerlendirme jürisi üyelerinden anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR'a ve Prof. Dr. Aydın KARAARSLAN' a, engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, değerli hocam Prof. Dr. Nedim SULTAN'a desteği ve güveni için teşekkürü borç bilirim.

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum bütün asistan, yüksek lisans, doktora öğrencileri ve laboratuvar çalışanlarına, Biyolog Raziye KURNAZ 'a çok teşekkür ederim.

ODTÜ Merkez Laboratuvarında atomik kuvvet mikroskobu çalışmalarını birlikte yürüttüğümüz, deneyimlerini sabırla paylaşan Dr. İbrahim ÇAM' a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, 1001 bilimsel ve teknolojik araştırma projelerini destek programı kapsamında olan 103S383 kodlu projenin bir kısmını oluşturan bu tez çalışması süresince maddi olarak destek veren TÜBİTAK' a teşekkürlerimi sunarım.

Manevi destekleriyle benimle olduklarını bildiğim tüm arkadaşlarıma, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca yardımları, anlayışı ve en önemlisi dostluğu ile hep yanımda olan Biyolog Gözde BİLGİLİ' ye, sabırla her zaman yanımda olan Murat AKPINAR' a desteği ve anlayışı için çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca verdiğim tüm kararlarda arkamda duran, sevgiyle destekleyen, tüm zorlukları benimle göğüsleyen anneme ve babama, beni büyüten büyük emeklerle yetiştirip bugünlere getiren sevgili anneannem ve dedeme, hayatımın her aşamasında beni yüreklendiren, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, ilgi ve sevgilerini her zaman hissettiğim tüm aileme sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Temel Tanımlar.....	3
2.2. Dezenfeksiyon.....	4
2.3. Dezenfektan ve Biyosid Kavramları	5
2.4. Dezenfektanların Sınıflandırılması	6
2.4.1. Kimyasal yapılarına göre dezenfektanlar	6
2.4.2. Etki derecelerine göre dezenfektanlar.....	7
2.4.3. Kullanım alanlarına göre dezenfektanlar.....	8
2.5. Biyosidlerin Etki Mekanizmaları	10
2.5.1. Hücre membran fonksiyonunu bozan biyosidler.....	11
2.5.2. Hücre proteinlerini denatüre eden biyosidler.....	11
2.5.3. Enzimlere ve metabolizmaya etki eden biyosidler.....	11
2.5.4. Nükleik asitlerin fonksiyonel gruplarını modifiye eden biyosidler	12
2.5.6. Bakteri sporlarına etki eden biyosidler	12
2.6. Biyosidlerin Antifungal Aktivitesi.....	12

Sayfa

2.7. Mikroorganizmalarda Biyosid Direnci	13
2.8. Fungal Direnç Mekanizmaları	14
2.8.1. İntrinsik direnç	15
2.8.2. Kazanılmış direnç	16
2.9. Çalışmada Kullanılan Biyosidlerin Genel Özellikleri ve Etki Mekanizmaları..	16
2.9.1. Klorheksidin (CHX).....	16
2.9.2. Benzalkonyum klorit (BNZ)	17
2.9.3. Sodyum hipoklorit (SHC).....	19
2.10. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM).....	19
2.10.1. Atomik kuvvet mikroskobunun genel kullanım amacı ve uygulama alanları.....	21
2.10.2. Atomik kuvvet mikroskobunun çalışma mekanizması.....	24
2.10.3. Atomik kuvvet mikroskobu inceleme yöntemleri.....	25
2.10.4. Atomik kuvvet mikroskobunun avantajları ve dezavantajları.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Örneğin Hazırlanması	29
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	29
3.2.1. Kullanılan cihaz ve laboratuvar malzemeleri	29
3.2.2. Kullanılan besiyerleri	30
3.2.3. Kullanılan kimyasal maddeler	30
3.3. Yöntemler.....	30
3.3.1. Besiyerlerinin hazırlanması.....	30
3.3.2. Biyosidlerin minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimal fungisidal konsantrasyon (MFK) değerlerinin belirlenmesi	31
3.3.3. Minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerlerinin mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmesi	31
3.3.5. Minimal fungisidal konsantrasyon (MFK) değerlerinin belirlenmesi	32

Sayfa

3.3.6. Atomik kuvvet mikroskobu için örnek hazırlanması.....	32
4. BULGULAR	35
4.1. Mikrodilüsyon Sonuçları.....	35
4.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Görüntüleri	35
4.2.2. Negatif kontrol hücrelerinin AFM sonuçları	35
4.2.2. Pozitif kontrol hücrelerinin AFM sonuçları.....	37
4.2.2. Klorhekzidin ile karşılaşmış <i>C. albicans</i> hücreleri için AFM sonuçları .	39
4.2.2 Benzalkonyum klorit (BNZ) için AFM sonuçları	46
4.2.3. Sodyum hipoklorit (SHC) için AFM sonuçları	50
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ	61
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	69

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Sterilizasyon yöntemleri	4
Çizelge 2.2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) tarafından belirlenen farklı dezenfeksiyon düzeyleri ve mikroorganizmalar üzerine etkisi.....	7
Çizelge 2.3. Tıbbi cihaz ve malzemelerin infeksiyon risk sınıflandırması ve kullanılacak yöntemler	9
Çizelge 2.4. AFM ile diğer mikroskopların karşılaştırılması	27
Çizelge 2.5. Atomik kuvvet mikroskopunun avantajları ve dezavantajları.	28

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Mikroorganizmaların biyosidlere karşı gösterdikleri direnç sıralaması	14
Şekil 2.2. Klorhekzidinin kimyasal yapısı	16
Şekil 2.3. Benzalkonyum kloritin kimyasal yapısı	18
Şekil 2.4. Taramalı prob mikroskopları (Scanning Prob Microscopes,SPM).....	20
Şekil 2.5. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)	24
Şekil 2.6. Atomik kuvvet mikroskobunun çalışma prensibi	25
Şekil 2.7. AFM çalışma yöntemleri (a) temaslı yöntem (b) temassız yöntem (c) vurmali yöntem	27

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Kontrol hücrelerinin 40x40 μm^2 alandaki iki boyutlu ve üç boyutlu AFM görüntüsü.....	36
Resim 4.2. Negatif kontrol hücrelerinin yüzey profilleri	36
Resim 4.3. 2xMİK konsantrasyonunda amfoterisin B'nin 8 saat ve 12 saat temas sürelerinde hücreler üzerine etkisi	37
Resim 4.4. 2xMİK konsantrasyonundaki AMB'nin 12. saatte por oluşturma etkisinin 10x10 μm^2 alanda 2D ve 3D görüntüsü.....	38
Resim 4.5. 2xMİK konsantrasyonunda AMB ile karşılaşan hücrelerde çukur oluşumunun profil analizi ile gösterilmesi	38
Resim 4.6. Nistatin (solda) ve amfoterisin B (sağda) ile karşılaşmış <i>C. albicans</i> 'ın hücre lizisi görüntüleri.....	39
Resim 4.7. 2xMİK konsantrasyonunda CHX' e maruz bırakılan hücrelerin 8. saatte 2D ve 3D görüntüleri.....	40
Resim 4.8. 4xMİK konsantrasyonunda CHX'e 8 saat maruz bırakılan maya hücrelerinin 3D ve faz görüntüleri.....	40
Resim 4.9. Kontrol hücrelerinin (solda) ve MİK konsantrasyonunda CHX' e maruz bırakılan maya hücrelerinin (sağda) 12. saatte iki boyutlu AFM görüntüleri	41
Resim 4.10. MİK konsantrasyonunda 24 saat CHX' e maruz bırakılan maya hücrelerinin geniş alan AFM görüntüleri	42
Resim 4.11. CHX' e MİK konsantrasyonunda 24 saat maruz bırakılan maya hücrelerinin üç boyutlu görüntüsü	42
Resim 4.12. Kontrol hücreleri (solda) ve 24 saat CHX ile muamele edilen hücrelerin (sağda) 20x20 μm^2 alandaki karşılaştırmalı faz görüntüsü.....	43
Resim 4.13. CHX ile muamele edilen maya hücrelerindeki por yapısının yüksek çözünürlüklü (4x4 μm^2) görüntüleri	43
Resim 4.14. Kontrol maya hücresi (solda) ve CHX ile muamele edilen maya hücresinin (sağda) yüksek çözünürlükte karşılaştırmalı üç boyutlu görüntüsü	44
Resim 4.15. Amf B ile karşılaşmış maya hücreleri (solda) ve CHX ile karşılaşmış maya hücrelerinin (sağda) por yapılarının karşılaştırılması	44
Resim 4.16. MİK konsantrasyonunda CHX ile karşılaşmış maya hücrelerinin 24. saatte profil analizi.....	45

Resim	Sayfa
Resim 4.17. MİK konsantrasyonunda CHX ile karşılaşmış tek bir <i>Candida</i> hücresinin 24. saatte pürüzlülük grafiği ve çukur oluşumunun gösterilmesi.....	45
Resim 4.18. 4xMİK konsantrasyonunda klorhekzidin etkisinin 12. saatte 3D ve faz ekranı görüntüleri	46
Resim 4.19. MİK konsantrasyonunda benzalkonyum klorit etkisinin 12. saatte iki boyutlu AFM görüntüsü	46
Resim 4.20. MİK konsantrasyonunda benzalkonyum kloritin 24 . saatteki etkisinin 2D ve faz ekranı görüntüsü.....	47
Resim 4.21. MİK konsantrasyonunda benzalkonyum kloritin 24. saatte etkisinin yüksek çözünürlüklü AFM görüntüsü	47
Resim 4.22. Negatif kontrol hücreleri (solda) ve 24 saat BNZ ile muamele edilen hücrelerin (sağda) karşılaştırmalı 3D görüntüsü	48
Resim 4.23. Negatif kontrol hücreleri (solda) ve 24 saat BNZ ile muamele edilen hücrelerin (sağda) karşılaştırmalı pürüzlülük grafiği	48
Resim 4.24. Benzalkonyum kloritin 2x MİK konsantrasyonunun 8. saatteki etkisi.....	49
Resim 4.25. Benzalkonyum kloritin 2xMİK konsantrasyonunda 24. saatteki etkisi.....	49
Resim 4.26. Nistatin (solda) ve 4xMİK konsantrasyonunda BNZ ile karşılaşmış hücrelerin (sağda) 12. saatte karşılaştırmalı görüntüsü	50
Resim 4.27. Sodyum hipokloritin MİK konsantrasyonunda 12. saatteki etkisinin 2D ve 3D AFM görüntüleri	51
Resim 4.28. Sodyum hipokloritin MİK konsantrasyonunda 24. saatteki etkisinin 2D ve 3D AFM görüntüleri	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

°C	Santigrat
2D	İki boyutlu
3D	Üç boyutlu
Hz	Hertz
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
nm	Nanometre

Kısaltmalar

Açıklamalar

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
AMB	Amfoterisin B
BNZ	Benzalkonyum klorit
CDC	Central of Disease Control and Prevention
CHX	Klorhekzidin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
KAB	Kuarterner Amonyum Bileşikleri
MFK	Minimum Fungisidal Konsantrasyon
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
NST	Nistatin
SDA	Sabouraud Dekstroz Agar
SDB	Sabouraud Dekstroz Broth
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SHC	Sodyum hipoklorit

1. GİRİŞ

Sterilizasyon ve dezenfeksiyon enfeksiyon kontrolünün temelidir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre hastanede yatarak tedavi gören yaklaşık her on kişiden birinde hastane enfeksiyonu görülmektedir [1]. Mikroorganizmalar, bulundukları ortam koşulları uygun olduğu takdirde kolaylıkla çoğalırlar. Uygunsuz koşullarda ölürler ya da üremek için uygun koşulların oluşmasını beklerler. Hastane içerisinde nozokomiyal enfeksiyon riskine karşı dezenfektanlar ile mikroorganizmaların kolonizasyonu büyük oranda engellenir [2].

Hastane ortamında gelişen enfeksiyonlardan 18. yüzyıl ve öncesine ait kaynaklarda bile bahsedilmektedir. Nozokomiyal enfeksiyonlara günümüzde halen çözüm bulunmaya çalışılmaktadır [3]. Yapılan çalışmalara göre son 25 yılda nozokomiyal kaynaklı fungal enfeksiyonların arttığı, önem sırasına göre dizildiğinde mantarların bakterilerden sonra ikinci sırada yer aldığı ve mortalite oranının oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Dezenfeksiyona gereken önemin verilmemesi nozokomiyal kaynaklı fungal enfeksiyonların hastada morbidite ve mortalite oranının artmasına neden olmaktadır [4].

Candida albicans, deride ve genital, ağız, rektum gibi mukoz membranlarda bulunan normal flora üyesidir. İmmünsupresif bireylerin sayısındaki artış, fırsatçı mantar enfeksiyonlarının da artışına neden olmaktadır. Mortalite oranı yüksek fırsatçı patojen olan *Candida albicans*, bağışıklığı baskılanmış bireylerde sistemik ve lokal mantar enfeksiyonlarının en sık görülen nedenidir [1].

Geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler olan biyosidler, antiseptik, dezenfektan ve koruyucu bileşikler olarak kullanılabilirler. Biyosidler özellikle sağlık alanında kullanımı oldukça yaygındır [5,6]. Hastane ortamında antiseptik, yüzey ve alet dezenfektanı olarak kullanımları mevcuttur. Çapraz enfeksiyonu önlemek amacıyla özellikle hastane içerisinde kullanılan malzemelere dezenfektan uygulanması şarttır [6].

Biyosidler antifungal etkisi, üremeyi durdurucu veya öldürücü olabilir. Biyosidler, mikroorganizma üzerinde bir veya birden fazla hedef bölgeyi etkileyebilirler. Biyosidler, fungal hücrelerde hücre duvarını, plazma membranını, ribozomları, nükleik asitleri, proteinleri ve enzimleri etkiler [7,8]. Mantarlarda biyosid ile ilk etkileşim hücre yüzeyinde başlar. Mantarlarda bariyer olarak görev yapan hücre duvarı ve hücre membranı,

biyosidlerle ilk etkileşime giren başlıca hedef bölgelerdir. Biyosid ilk etkileşimden sonra hücreye penetre olur, hücre içerisindeki hedefine yönelir ve metabolik aktivitelerin değişimine yol açar [9].

Hastanelerde biyosidlerin gereksiz yere ve önerilen konsantrasyonların altında kullanılması mikroorganizmalarda direnç gelişimini hızlandırmaktadır [10]. Biyosidlere karşı fungal direnç intrinsik ya da kazanılmış olabilir. Membran geçirgenliğinin azalması, eflüks pompaları ve H^+ -ATPaz aktivitesi, tamir mekanizmaları, fenotipik değişim ve biyosidlerin inaktivasyonu mantarlar için intrinsik direnç mekanizmalarıdır [9]. Mantarlarda kazanılmış direnç varlığına ait henüz bir veri bulunmamaktadır [11]. Biyosidlerin mantar üzerine etkileri ve mekanizmaları hakkındaki veriler son derece kısıtlıdır. Antifungal etkinin, biyosidlerin bakteri üzerindeki etkisine benzer olduğu düşünülmektedir [12].

Bir çeşit taramalı prob mikroskobu olan atomik kuvvet mikroskobu (AFM), nano newton boyutta kuvveti ölçerek hücre yüzeyinin yüksek çözünürlükte üç boyutlu haritasını çıkarabilir. Yüzeyde görüntü analizi sağlar ve pürüzlülük, faz, en, boy, kalınlık gibi yüzeyel değişiklikleri tespit eder. Yüzeyin üç boyutlu profilinin, yüzey pürüzlülüğünün, yüzeydeki deformasyonun ve yüzey üzerindeki değişimin görüntülenmesi açısından son derece kullanışlıdır. AFM, biyolojik membran özelliklerinin belirlenmesinde son on yılda geniş kullanımı olan yeni bir tekniktir. AFM, canlı ve ölü hücre yüzeylerinin doğal fizyolojik koşullara uygun şekilde detaylı olarak incelenmesine olanak sağladığından yaşam ve sağlık bilimleri alanında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [13,42].

Bu çalışmada, biyosid olarak adlandırılan dezenfektan ve koruyucu maddeler arasından seçtiğimiz sodyum hipoklorit (SHC), benzalkonyum klorit (BNZ) ve klorhekzidinin (CHX) standart suş ATCC 10231 *Candida albicans* kökeni üzerinde in vitro etkilerinin ayrıntılı mikroskopi yöntemlerinden biri olan atomik kuvvet mikroskobu (Atomic Force Microscopy, AFM) kullanılarak gösterilmesi ve mantarda oluşan morfolojik değişikliklerin incelenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Temel Tanımlar

Dekontaminasyon

Mikroorganizmaların uzaklaştırılmasına yönelik yapılan her türlü işleme denir.

Temizlik

Yabancı maddelerin mekanik olarak uzaklaştırılması işlemidir.

Antisepsi

Canlı doku üzerindeki patojen mikroorganizmaların kimyasal maddeler kullanılarak öldürülmesi veya üremelerinin engellenmesidir. Vücuda uygulanan dezenfeksiyon işlemidir. Antisepsi işleminde kullanılan kimyasal maddelere antiseptik adı verilir.

Asepsi

Ortamdaki patojen mikroorganizmaların yok edilmesi işlemidir.

Sterilizasyon

Sporlar dahil olmak üzere, her türlü mikroorganizmanın fiziksel ve kimyasal yollarla tamamen yok edilmesi işlemidir. Sterilizasyon işlemi ile sporlu ve sporsuz tüm bakteriler, mantarlar, parazitler ve virüsler tamamen canlılıklarını yitirirler. Sterilizasyon sonrası tek bir canlı mikroorganizma kalma olasılığı $\leq 10^{-6}$ olmalıdır. American Association of Medical Instrumentation (AAMI) 1995'te bu oranı sterilite güvence düzeyi olarak belirlemiştir [14,15]. Sterilizasyon amacıyla kullanılan kimyasal maddelere sporisid (kimyasal sterilan) denir.

Çizelge 2.1. Sterilizasyon yöntemleri



2.2. Dezenfeksiyon

Sporlar dışında patojen mikroorganizmaların yok edilmesi işlemidir. Etkili bir dezenfeksiyon için bakteri, mantar, parazit gibi mikroorganizmaların vejetatif formları ölmeli ve virüsler inaktive olmalıdır. Dezenfeksiyon ile ortamdaki tüm mikroorganizmalar ölmeyebilir, miktarın kabul edilebilir bir düzeye düşürülmesi yeterlidir [15,6]. Buna karşın, bazı dezenfektanlar sporosid etkilidir. Mikroorganizmalardaki spor yapısı dezenfektanın etkisini güçleştirmesine rağmen uzun süreli temas ve uygun konsantrasyonda sporları da tahrip edebilir. Bu nedenle dezenfeksiyon mikroorganizma sayısının azaltılmasından sterilizasyona kadar geniş bir spektruma sahiptir [15]. Dezenfeksiyon kimyasal ve fiziksel yöntemlerle yapılabilir.

Dezenfeksiyon yöntemleri;

1. Fiziksel yöntemler
 - Kaynatma
 - Pastörizasyon
 - Temizlik
 - Kısa süreli ultraviyole uygulaması
2. Kimyasal yöntemler

Dezenfeksiyona etki eden faktörler;

1. Dezenfektan maddenin konsantrasyonu
2. Dezenfektanın temas süresi
3. Isı

4. Ortamın pH derecesi
5. Ortamın osmotik basıncı
6. Ortamda bulunan organik maddeler ve miktarı
7. Ortamda dezenfektan ile antagonistik etki gösteren kimyasalların varlığı
8. Yüzey gerilimini azaltıcı maddelerin varlığı
9. Dezenfeksiyona maruz bırakılan nesnenin yapısı ve dezenfektana dayanıklılığı
10. Nesnenin dezenfeksiyon öncesi temizliği
11. Mikroorganizmalara bağlı faktörler

(mikroorganizmanın yapısı, üreme periyodu, dezenfektana karşı direnç durumu, mikrobiyal kontaminasyon miktarı) [16,17].

2.3. Dezenfektan ve Biyosid Kavramları

Dezenfeksiyon amacıyla kullanılan kimyasallara dezenfektan adı verilir. Dezenfektanlar, EPA (Enviromental Protection Agency) ve FDA (Food and Drug Administration) tarafından denetlenmektedir [18]. Dezenfektan maddeler toksik özellik gösterebilir. Bu nedenle, tüm antiseptikler dezenfektan özelliği taşıdığı halde tüm dezenfektanlar antiseptik özellik taşımazlar.

Biyosid, dezenfektanla aynı anlama gelmekle beraber hem canlı dokuda hemde cansız nesnelerde kullanılabildiğinden antiseptik ve koruyucu özellikli bileşikler olarak da bilinmektedir [6,12]. Biyosidler, mikroorganizmaları inaktive eden geniş spektrumlu kimyasal ajanlardır [11].

İdeal Bir Dezenfektanda Bulunması Gereken Özellikler;

- Güçlü ve geniş spektrumlu olmalıdır.
- Hızlı etki etmeli ve etkisi olabildiğince uzun sürmelidir.
- Düşük konsantrasyonlarda çok sayıda mikroorganizma türüne etkili olmalıdır.
- Çevresel faktörlerden etkilenmemeli ve kan, serum, mukus, tükürük gibi organik maddelerin varlığında etkinliğini korumalıdır.
- Etkili olduğu ısı ve pH aralığı geniş olmalıdır.
- Kolay temin edilebilir olmalıdır.

- Kullanımı kolay olmalıdır.
- Ekonomik olmalıdır.
- Çözücü içerisinde kolay çözünmeli ve homojen dağılmalıdır.
- Çözücü içerisinde kimyasal etkisini kaybetmemelidir.
- Rahatsız edici kokmamalı ya da kokusuz olmalıdır.
- Renksiz olmalı ve boyama yapmamalıdır.
- Atıkları çevreyi kirletmemelidir.
- Uygulandığı maddeleri bozmamalı ve leke bırakmamalıdır.
- Tahriş edici ve toksik olmamalıdır.
- Vücut doku ve hücrelerine zarar vermemelidir [19,20].

2.4. Dezenfektanların Sınıflandırılması

Dezenfektanlar, kimyasal yapılarına, etki derecelerine, kullanım alanlarına ve etki mekanizmalarına göre sınıflara ayrılırlar [6,21].

2.4.1. Kimyasal yapılarına göre dezenfektanlar

Dezenfektanlar kimyasal yapılarına göre çeşitli gruplara ayrılırlar. Temelde organik ve inorganik olmak üzere ikiye ayırabiliriz.

Anorganik bileşikler

Anorganiklerin etkisi suda iyonize olma derecesi ile bağlantılıdır.

- Asitler ve alkaliler (Amonyak, hidroklorik asit, sülfürik asit, potasyum hidroksit ve sodyum hidroksit)
 - Ağır metaller ve tuzlar (Bakır, gümüş, cıva tuzları)
 - Oksidan maddeler
 - Halojenler ve halojen içerikliler
- a. Klor ve klor bazlı bileşikler (Sodyum hipoklorit)
- b. İyot ve iyot bazlı bileşikler (İyodoforlar, povidon iyot)
- Peroksitler ve peroksijen komponentleri (Hidrojen peroksit, perasetik asit)
 - Kireçli bileşikler

Organik bileşikler

Yapılarındaki karbon ve hidrojen sayısı ile orantılı olarak organik dezenfektanların etkisi artar.

- Organik metal bileşikleri
- Fenol ve fenol bileşikleri (krezol, lizol, triklosan)
- Deterjanlar

a. Katyonik deterjanlar (Benzalkonyum klorit gibi kuaterner amonyum bileşikleri)

b. Anyonik deterjanlar

c. Noniyonik deterjanlar

- Biguanidler (Klorhekzidin)
- Organik çözücüler (alkoller, kloroform, eter, toluen, aseton)
- Alkilleyici ajanlar (Formaldehit, gluteraldehit, etilen oksit)
- Boyalar [21,22].

2.4.2. Etki derecelerine göre dezenfektanlar

Sterilizasyon için az steril, çok steril gibi herhangi bir değerlendirme söz konusu değilken, dezenfeksiyon işlemi yüksek, orta ve düşük olmak üzere farklı düzeylerde gerçekleştirilir [16]. Her dezenfeksiyon düzeyi için kullanılan dezenfektanlar ve etkili oldukları mikroorganizmalar farklılık gösterir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) tarafından belirlenen farklı dezenfeksiyon düzeyleri ve mikroorganizmalar üzerine etkisi [21,2]

Dezenfeksiyon Düzeyi	Bakteriler			Mantarlar	Virüsler	
	<i>Vejetatif</i>	<i>Spor</i>	<i>Mikobakteri</i>		<i>Zarflı</i>	<i>Zarfsız</i>
Sterilizasyon	+	+	+	+	+	+
Yüksek	+	+-	+	+	+	+
Orta	+	-	+	+ *	+	+
Düşük	+	-	-	+ -	+	-

+ : Etkili - : Etkisiz

*: Aseksüel sporlar dahil, klamidoporlar ve seksüel sporlar genellikle hariç

Yüksek düzey dezenfektanlar

Çok dirençli bakteriyel endosporlar hariç mikroorganizmaların tümünü <12 dakikada öldürebilen sporosid özelliği olan dezenfektanlardır [23,24]. Tüm bakteri sporlarını inaktive eden sterilizan etkili ve sterilizasyon düzeyinde etkili olmayan ancak bakteri sporlarının çoğunu öldüren yüksek düzey dezenfektanlar olmak üzere iki gruptur [2]. Yüksek düzey dezenfektanlar, sterilizasyon için gereken süreden (3 saat ve üzeri) daha kısa sürede (5-20 dakika) mikroorganizmaları inaktive edebilirler [25,26].

Gluteraldehit, formalaldehit, orto-fitalaldehit (OPA), hidrojen peroksit, perasetik asit ve sodyum hipoklorit yüksek düzey dezenfeksiyonda kullanılan dezenfektanlara örnek gösterilebilir [14].

Orta düzey dezenfektanlar

Bakteri sporlarına karşı etkisiz, mikobakteriler, diğer sporsuz bakteriler, virüs ve funguslara karşı genellikle 15 dakikada etki eden dezenfektanlardır [20]. Bu tür biyosidler, EPA (Environmental Protection Agency) tarafından tüberküloid olarak tanımlanmıştır [27]. Fenol ve fenol bileşikleri, iyodoforlar, etil ve izopropil alkol orta düzey dezenfeksiyonda kullanılan dezenfektanlara örnek gösterilebilir [5].

Düşük düzey dezenfektanlar

Bakteri sporlarına, mikobakterilere ve zarfsız virüslere karşı etki göstermeyen, vejetatif bakterilerin çoğuna, bazı mantar ve virüslere ≤ 10 dakikada etki eden dezenfektanlardır [23,26]. Bu biyosidler, EPA (Environmental Protection Agency) tarafından hastane dezenfektanı olarak adlandırılır [27]. Fenol ve fenol bileşikleri, iyodoforlar, sodyum hipoklorit, kuarterner amonyum bileşikleri, etil ve izopropil alkol düşük düzey dezenfeksiyonda kullanılan dezenfektanlara örnek gösterilebilir [5].

2.4.3. Kullanım alanlarına göre dezenfektanlar

Dezenfektanlar, sağlık alanında kullanımlarına göre alet dezenfektanları, yüzey dezenfektanları ve antiseptik olarak kullanılan dezenfektanlar olmak üzere sınıflandırılabilirler [21].

Alet dezenfektanları

Hastanelerde kullanılan malzemelerin enfeksiyon riski farklılıklar gösterir. Bu nedenle, dezenfeksiyon düzeyi kullanılan araç ve gereçlerin enfeksiyona yol açabilme riskine göre seçilir. Hastane içerisinde ve hasta bakımında kullanılan alet ve malzemeler Spaulding sınıflamasına göre kritik, yarı kritik ve kritik olmayanlar şeklinde üç gruba ayrılmaktadır (Çizelge 2.3). Bu sınıflama 1968 yılından beri halen uygulanmaktadır [20,28].

Çizelge 2.3. Tıbbi cihaz ve malzemelerin enfeksiyon risk sınıflandırması ve kullanılacak yöntemler [20,14]

Spaulding sınıfı	İnfeksiyon riski	Dezenfeksiyon düzeyi ve yöntem	EPA ürün sınıfı
Kritik malzeme (Steril doku veya vasküler sisteme giren)	Yüksek	Sterilizasyon (Buhar ,plazma, etilen oksit) Sıvı sporisidal kimyasal (3 saat uzun süreli temas)	Sterilan/ Dezenfektan
Yarı kritik malzeme (Mukozalarla temas eden)	Orta	Nemli Isı Yüksek düzey dezenfeksiyon (Yüksek düzey dezenfektan ile 5-20 dakika) Orta düzey dezenfeksiyon (≤ 10 dakika temas)	Sterilan/ Dezenfektan Tüberkülosidal dezenfektan
Kritik olmayan malzeme (Sağlam deri ile temas eden, mukoza ile temas etmeyen)	Düşük	Düşük düzey dezenfeksiyon (≤ 10 dakika temas)	Tüborkülosidal aktivite göstermeyen dezenfektan

Kritik alet ve malzemeler

Steril vücut bölgelerine, vücut boşluklarına, vücut sıvılarına veya damar sistemine doğrudan temas eden alet ve malzemelerdir. Bu malzemeler çok az miktarda mikroorganizma içerseler dahi yüksek enfeksiyon riski oluşturduklarından kullanılabilmeleri için steril olmaları şarttır. Cerrahi materyaller, implantlar, iğneler, kardiyak ve üriner kateterler kritik malzemelere örnek gösterilebilir [20,14].

Yarı kritik alet ve malzemeler

Mukoza veya bütünlüğü bozulmuş cilde temas eden ancak steril vücut bölgelerine girmeyen alet ve malzemelerdir. Bu malzemeler üzerinde az sayıda bakteri sporu kalsa bile

ciddi risk oluşturmazlar. Yarı kritik alet ve malzemelerin güvenli kullanımı için yüksek düzey dezenfeksiyon işlemi uygulanması yeterlidir, ağız mukozasıyla temas eden aletler haricinde sterilizasyon şart değildir. Bunlar arasında endoskoplar, laringoskoplar, bronkoskoplar, solunum aletleri, anestezi ekipmanı ve termometreler gibi malzemeler yer alır [10,21].

Kritik olmayan alet ve malzemeler

Bütünlüğü bozulmamış ciltle temas eden ve mukoza teması olmayan alet ve malzemelerdir. Sağlam deri mikroplar için etkili bir bariyer olduğundan infeksiyon riski çok azdır. Fakat bu malzemeler çapraz bulaşlara neden olabilirler. Kritik olmayan malzemeler için temizlik işlemi yeterlidir ancak vücut sıvıları ile kirlenme var ise düşük düzey dezenfeksiyon uygulanmalıdır. Steteskop, EKG elektrotları, tansiyon aleti, ördek, koltuk değnekleri, hasta odasındaki mobilyalar, hasta yatağı ve örtüsü bu malzemelere örnek gösterilebilir [20,14].

Yüzey dezenfektanları

Klorin ve klorin bileşikleri, alkol çözeltileri (etil ve izopropil alkol), kuarterner amonyum bileşikleri, süperoksitletlenmiş (elektrolize) su ve fenolikler yüzey dezefektanları arasında gösterilebilirler [21].

Antiseptikler

Sabun, iyodoforlar, alkol çözeltileri, biguanidler, kuarterner amonyum bileşenleri, heksaklorofen, paraklorometaksilenol ve triklosan antiseptik olarak kullanılan dezenfektanlar arasında yer alır [21].

2.5. Biyosidlerin Etki Mekanizmaları

Biyosidler, mikroorganizma üzerinde değişik mekanizmalarla öldürücü (sidal) veya üremelerini durdurucu (statik) etki gösterebilirler. Biyosidler, bakteri,maya,küf,virüs gibi farklı mikroorganizmalar üzerinde farklı etkilere sahiptirler. Virüsleri öldürenler virüs id, bakterileri öldürenler bakterisid, bakteri üremesini durduranlar bakteriyostatik, mantarları öldürenler fungusid adını alırken mantarın üremesini durduranlar ise fungistatik olarak

adlandırılır. Mikrobiyostatik etki gösteren biyosidlerin bir çoğu yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında biyosidal etki gösterebilirler [12].

Biyosidler, hücrenin genetik materyali, proteinleri, enzimleri, hücre duvarı, hücre membranı gibi çeşitli kısımlarını ve biyosentez sürecini hedef alırlar [29]. Biyosidlerin bir kısmı tek bir yolla etkili olurken, bir kısmı birden çok yolla etkili olabilir. Bunlar, hücre duvarı yapısını veya hücre membranını tahrip etme, hücrenin iç dengesini bozma, hücre içi bileşenlerinin dışarıya sızmasına neden olma, mikroorganizmaların enzim, koenzim ve diğer protein yapılarını oksitleyerek ya da alkilleyerek bozma, elektron transportu ve oksidatif fosforilasyonu inhibe etme, makromoleküllerle etkileşme veya bunların sentezini önleme gibi mekanizmalardır [11,7].

2.5.1. Hücre membran fonksiyonunu bozan biyosidler

Membran aktif ajanlar diğer etkilerinin yanı sıra, hücre içi materyallerin dışarı sızmasına neden olurlar [8]. Bu biyosidlerin antimikrobiyal performansında yüzey gerilimi önemli bir rol oynar. İyonik veya noniyonik yüzey aktif maddeler olan deterjanlar, organik çözücüler, fenol ve türevleri hücre zarına etki eden biyosidlerdir. Deterjanlar, yüzey gerilimini azaltan ve çözücü özellikleri iyi olan maddelerdir. En etkili olanlar katyonik deterjanlar yani kuarterner amonyum bileşikleridir. Organik çözücülere kloroform, toluen ve alkoller örnek gösterilebilir. Hücre membranının lipid yapısını ve hücre proteinini denatüre ederek etki ederler. Fenoller ise hücre içeriğinin dışarı boşalmasına neden olur ve mikrobisidal etki gösterirler [30, 21].

2.5.2. Hücre proteinlerini denatüre eden biyosidler

Dezenfektanların etki mekanizmalarından biri de protein yapısındaki maddeleri denatüre ederek hücrenin normal yapısının bozulmasına ve hücre ölümüne neden olmaktır. Ağır metaller, oksitleyici ajanlar, alkilleyici ajanlar, alkoller, asitler ve alkaliler bu grupta yer alırlar [31,21].

2.5.3. Enzimlere ve metabolizmaya etki eden biyosidler

Biyosidlerin bir kısmı, mikroorganizma enzimlerine bağlanırlar. Bu enzimlerin kimyasal yapısını ve aktivitesini değiştirirler. Buna bağlı olarak metabolizma bozulur ve bu süreç

mikroorganizmanın ölümüyle sonuçlanır. Ağır metaller, deterjanlar, oksidan ajanlar ve alkilen maddeler bu şekilde etki eden biyosidlerdir [10,21,11].

2.5.4. Nükleik asitlerin fonksiyonel gruplarını modifiye eden biyosidler

Bu grupta yer alan biyosidler, nükleik asitlere (DNA veya RNA) farklı mekanizmalarla etki edebilirler. Mikroorganizma DNA'sı ile bileşikler oluşturarak, nükleik asidin replikasyonunu ve protein sentezini engellerler. Bu durumda mikroorganizma ölür. Bu grup için okside edici maddeler, aldehitler, hipokloritler ve etilen oksit örnek gösterilebilir [10,21].

2.5.5. Bakteri sporlarına etki eden biyosidler

Dezenfeksiyon maddelerinin çoğu bakterilerin vegetatif şekilleri öldürülerek bunların tekrar spor yapmalarını engeller, sporosidler bakteri sporlarını da öldüren kimyasal maddelerdir. Kuarterner amonyum bileşenleri, fenol, glutraldehid, formaldehid, hipoklorit, iyot, hidrojen peroksit ve etilen oksit sporilasyonun farklı aşamalarında etkili biyosidlerdir [21,11].

2.6. Biyosidlerin Antifungal Aktivitesi

Biyosidlerin bakteriler üzerindeki etkisi ve etki mekanizması ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Buna rağmen, fungal etki mekanizmaları hakkında literatür bilgisi oldukça azdır [12,32]. Mantarlar için biyosid aktivitesinin vejetatif bakterilerle benzer olduğu görüşü, bu mikroorganizmaların yapılarının ve kimyasal özelliklerinin farklılığı nedeniyle kesin değildir. Mantarlarda da bakterilerde olduğu gibi, hücre duvarı ile ilk etkileşimden sonra biyositin hücre zarına penetre olması ve hücre içerisindeki hedefine yönelmesi şeklinde olduğu düşünülmektedir [32].

Fungal hücrelerde potansiyel hedefler hücre duvarı, plazma membranı, ribozomlar, nükleik asitler, yapısal ve fonksiyonel proteinleri kapsar [8]. Klorhekzidin, kuarterner amonyum bileşikleri, alkoller, fenoller, organik asit ve esterler gibi birçok antifungal ajan için başlıca hedef bölge plazma membranıdır [9,32]. Hücre duvarı ise başta aldehitler olmak üzere biguanidler ve kuarterner amonyum bileşikleri için hedef bölgedir [32].

Antifungal etkiye sahip biyosidlerin, sadece sağlık alanında değil ürünlerin korunması açısından tarım ve endüstride de yaygın kullanımı nedeniyle önemi büyüktür [8].

2.7. Mikroorganizmalarda Biyosid Direnci

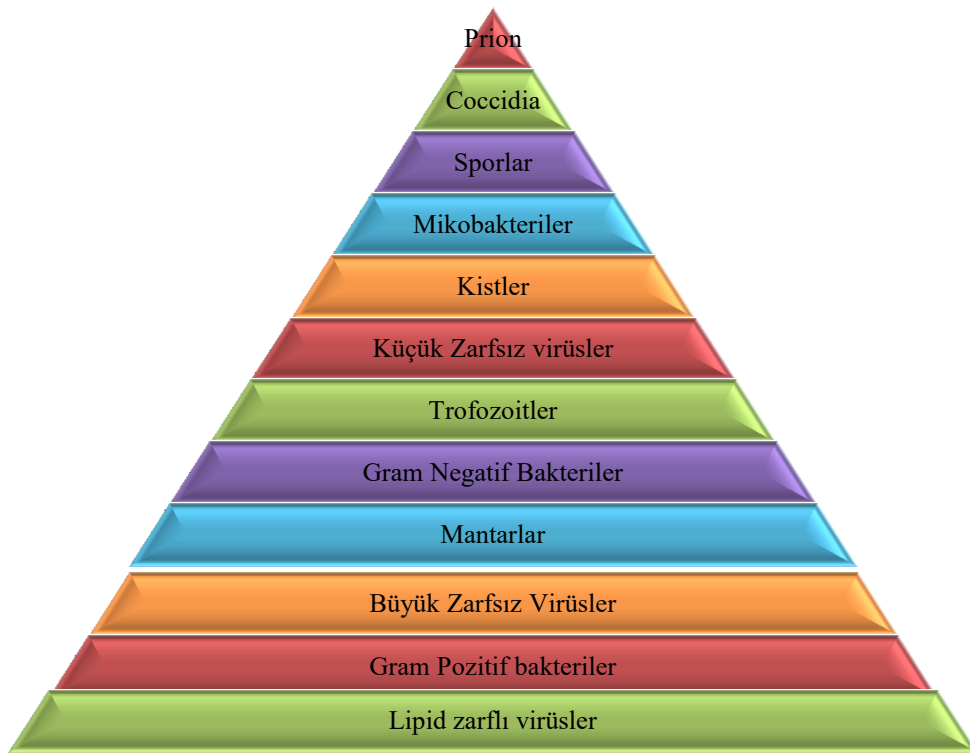
Dezenfektan direnci yeni bir olgu değildir. Chaplin 1952'de ilk kez kuarterner amonyum bileşiklerine karşı dirençli suşlar izole etmiştir. Mikroorganizmalar tarafından antibiyotik ve antifungallere karşı direnç gelişebildiği gibi yaygın kullanımları nedeniyle dezenfektanlara karşı da direnç görülebilir. Fakat antibiyotikler spesifik tek bir bölgeye etki ederken, dezenfektanlar için birçok hedef bölge mevcuttur. Dezenfektanların birden fazla mekanizma ile aynı anda etkili olmasından dolayı direnç gelişiminin kolaylıkla ortaya çıkmayacağı düşünölmektedir [5].

Hastane ortamında üreyen suşlar ile aynı kökene ait kültür ortamında üreyen suşlar karşılaştırılmıştır. Hastane ortamından ve yatan hastalardan izole edilen suşların daha dirençli olduğu görölmüştür. Yapılan çalışmalarda hastane kökenli bakteri suşlarının lipopolisakkaritlerinde daha fazla fosfat bağlı arabinoz bulunmuştur. Buna bağlı olarak dezenfektanların hücre duvarına affinitesinin azaldığı ve bu suşlarda dezenfektan direncinin arttığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeni seleksiyon ve mutasyondur [5].

Hastane ortamında kullanılan dezenfektanların seçimi çok önemlidir. Doğru dezenfektan, uygun konsantrasyonlarda ve yeterli süre kullanılmazsa dezenfektanlara karşı direnç gelişebilir [33]. Yetersiz dezenfeksiyon uygulaması mikroorganizmalar arasında direnç genleri olanların seçilmesi, direnç genlerinin kazanılması veya duyarlı mikroorganizmaların adaptasyonu ile birçok mikroorganizma popülasyonunun dezenfektan duyarlılığı azalabilir. Hatta adaptasyon, genetik direncin kazanılması, stres yanıtı veya biyofilm oluşumu ile yüksek dirençli hale gelebilir [5].

Dirençli suşların seleksiyonu, risksiz bölgelerde rutin olarak dezenfektan kullanımının engellenmesi ve sadece temizlik işleminin uygulanması ile önlenabilir [2]. Kullanılan dezenfektanın belirli aralıklarla etki mekanizması farklı bir dezenfektanla değiştirilmesi ile direnç gelişiminin önlenmesine ilişkin görüşler çelişkilidir. Dezenfektan rotasyonuna karşı olanların görüşü, direncin pratikte laboratuvar ortamında olduğu kadar sık gelişmeyeceği bunun ancak intrinsik direnç oluşumu ile sorun teşkil edeceği yönündedir [5].

Dezenfektanlara karşı direnç mikroorganizma çeşitleri arasında farklılık gösterir. Dezenfektanlara en dirençli yapı prionlardır (CJD, BSE). Prionlar proteazlara dirençli protein yapılarından dolayı hemen hemen her biyosite dirençlidir. Prionları koksidler (*Cryptosporidium*), bakteriyel sporlar (*Bacillus*, *Clostridium difficile*), mikobakteriler (*M. tuberculosis*, *M. avium*) ve kistler (*Giardia*) takip eder. Biyosidler, virüslerin lipid zarfını, kapsidini ve genomunu hedefler. Küçük zarfsız virüsler (*Polio virüs*) büyük zarfsız virüslerden (*Enterovirüs*, *Adenovirüs*) dirençli iken, onlarda lipid zarflı virüslere (HIV, HBV) göre daha dirençlidir. Hücre duvar yapısı ve kimyasal bileşiminden dolayı gram pozitif bakteriler (*Pseudomonas*, *Providencia*) gram negatif bakterilere (*S. aureus*, *Enterococcus*) göre dezenfektanlara daha duyarlıdır. Direnç sıralamasında mantarlar (*Candida*, *Aspergillus*) dezenfektanlara gram pozitif bakterilerden daha dirençli, gram negatif bakterilerden ise daha duyarlıdır (Şekil 2.1) [5,11].



Şekil 2.1. Mikroorganizmaların biyosidlere karşı gösterdikleri direnç sıralaması (Yukarıdan aşağıya doğru gidildikçe biyosidlere direnç azalmakta, duyarlılık artmaktadır.)

2.8. Fungal Direnç Mekanizmaları

Birçok çalışma fungal hücre duvarının biyosid penetrasyonunu azaltmada önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Mantarlarda hücre duvarı bileşimi, gözenekli yapı ve hücre duvar

kalınlığı fungal direnci etkileyen etmenlerdir. Hiom ve arkadaşlarının *Saccharomyces cerevisiae* üzerinde yapmış olduğu çalışmalar ile mantarların duvarındaki glukan yapısı biguanidlerin hücre içine girişini sınırlandırmıştır. Mannan mutantları vahşi kökenle benzer derecede duyarlılık göstermiştir. Bu nedenle mannanın hücre direncinde rol oynadığı düşünülmemektedir. Ayrıca suşların yaşına bağlı olarak duvar kalınlığının artması, gözenekli yapının ise azalması biyosid direncini arttırmıştır [11,32].

Mantarlar farklı biyosidlere farklı direnç cevabı verebilirler. Örneğin klorheksidini dışarı atarak, formaldehite enzimatik inaktivasyon ve etanole ise fenotipik değişim gibi direnç mekanizmalarıyla cevap oluştururlar [11].

Alkoller, mayaların lipid kompozisyonu ve zar akışkanlığı üzerinde önemli rol oynarlar [8]. Farklı büyüme koşulları maya hücrelerinde etanol duyarlılığını değiştirir. Hücre membranında bol miktarda linoleik asit bulunan mayalar, oleik asitten zengin membranı olanlara göre etanole daha dirençlidir [5,11].

Ayrıca fungal sporların da, bakteriyel sporlarla karşılaştırıldığında biyosidlere daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Yapılan birkaç araştırma ile *S. cerevisiae*'nin askosporlarının hipokloritlere, alkollere ve kuarterner amonyum bileşiklerine karşı vejetatif mantar hücresinden oldukça dirençli olduğu bulunmuştur. Fakat aynı etki perasetik asit için görülmemiştir [32].

Küf sporlarının sporsuz bakterilerden daha dirençli, bakteri sporlarından daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Birçok biyosid çeşidi kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edilen fungisidal konsantrasyonlar, küflerin çoğunlukla mayalardan daha dirençli olduğunu göstermektedir. Bu durumun küflerin duvar yapısı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [8,11].

Diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi mantarlarda da intrinsik (doğal) ve kazanılmış direnç olmak üzere iki genel direnç mekanizması vardır [5].

2.8.1. İntrinsik direnç

Mikroorganizmalar için intrinsik direnç dezenfektanlarla temas olmadan kromozomal genlerle ifade edilen doğal dirençtir [5,32]. Mantarlarda intrinsik direnç, hücre

geçirgenliğinde bozulma ve yapısal parçalayıcı enzimler ile ilişkilidir. Mantarlar için intrinsik direnç mekanizmaları membran geçirgenliğinin azalması, eflüks pompaları ve H⁺-ATPaz aktivitesi, tamir mekanizmaları, fenotipik değişim ve biyosidlerin inaktivasyonudur [32]. Fenotipik adaptasyon olan biyofilm oluşumu da bir intrinsik direnç mekanizmasıdır.

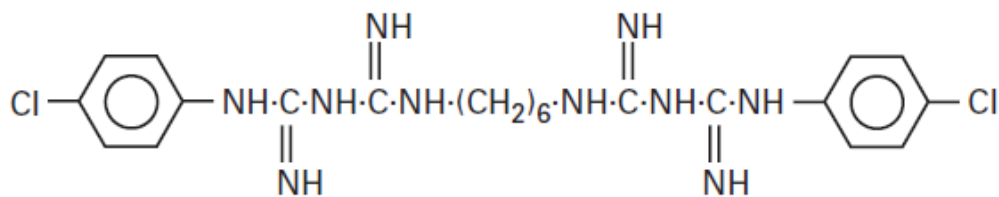
2.8.2. Kazanılmış direnç

Mikroorganizmalar için kazanılmış direnç, başka bir hücreden genetik materyalin (plazmid, transpozon) aktarımı veya mutasyon ile gerçekleşir [6]. Mutasyonların veya plazmidlerin etkisi ile fungal kazanılmış direnç hakkında veri bulunmamaktadır [11].

2.9. Çalışmada Kullanılan Biyosidlerin Genel Özellikleri ve Etki Mekanizmaları

2.9.1. Klorheksidin (CHX)

Klorhekzidin (CHX) biguanid türevi bir bileşiktir (Şekil 2.2). Klorhekzidin su içerisinde kolaylıkla çözünmez, bu sebeple diasetat, dihidroklorit ve glukonat ile birlikte bulunur. %4 klorhekzidin glukonat ve %4 isopropil alkol en sık kullanılan CHX solüsyonlarıdır. Klorhekzidin en yüksek aktiviteyi pH 7-8' de gösterir, pH düştükçe etkisi azalır. Organik maddelerin varlığında aktiviteleri azalır. Ayrıca katyonik yapıları nedeniyle, sabunlar ve diğer anyonik bileşikler klorhekzidin etkisini olumsuz etkiler [10].



Şekil 2.2. Klorhekzidinin kimyasal yapısı

Antimikrobiyal ajan olarak ilk kez 1954'de tanımlanan klorheksidin, günümüzde sağlık alanında kullanılan başlıca antiseptiklerden biridir. Klorheksidinin alkol çözeltisi çok etkili bir deri dezenfektanıdır. Yüzeyle olan affinitesinden dolayı antiseptik etkisi uzun sürelidir. Toksik ve iritan etkisi ise zayıftır [34,35].

Gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkisi geniş spektrumludur fakat sporosidal etkiye sahip değildir. Klorhekzidin glukonat hücre içerisine bakteri ve mantarlar tarafından hızlı bir şekilde alınır. Fakat mantarlara etkisi daha çok fungistatiktir. Mikobakteriler üzerinde öldürücü etkisi yoktur, bakteriyostatik etkiye sahiptir. Klorhekzidin 98-100 °C'de etanol solüsyonu içerisinde tüberküloid olarak etki edebilir. Virüsidal etkisi sınırlıdır. Zarflı virüslere göre zarfsız virüslere karşı daha düşük aktivite gösterir [10,21].

Biguanidler pozitif yüklü olmalarından dolayı hücre membranındaki negatif yüklü gruplar ile tepkimeye girerek membran geçirgenliğini bozarlar [10]. Klorhekzidin hedef bölgesi hücre membranıdır. CHX mikroorganizma yüzeyine güçlü bir şekilde bağlanır. CHX etkisi konsantrasyon bağımlıdır. Düşük konsantrasyonlarda K^+ iyon sızıntısına neden olur ve membran geçirgenliğini artırır ancak ölüm oranı azdır. Daha yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında klorhekzidin hücre proteinleri ve nükleik asitlerle etkileşimi sonucu sızıntı artar, sitoplazmik içerik pıhtılaşır ve hücre ölümü gerçekleşir [8].

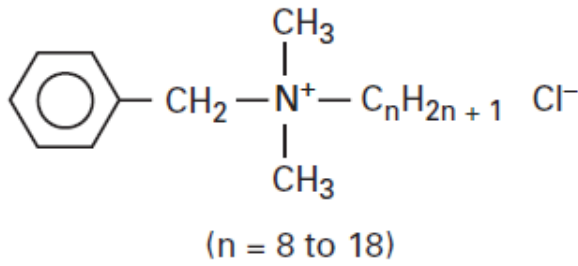
Ayrıca klorhekzidin bakteriyostatik konsantrasyonlarda membran bağlı adenosin trifosfatazı (ATPaz) inhibe ettiği bilinmektedir. CHX gram negatif bakterilerin periplazmik enzimlerini serbest bırakır ve membran fonksiyonunu bozarak etki eder [8].

Klorhekzidin maya ve küfler üzerindeki aktivitesi sporsuz bakterilere göre daha azdır. [8]. *S. cerevisiae* klorhekzidine *Candida* kökenlerine göre daha duyarlıdır. Buna rağmen klorhekzidin *Candida* spp. için fungisidal olabilir [32].

2.9.2. Benzalkonyum klorit (BNZ)

Yüzey aktif (surfektan) maddeler, hidrofobik ve hidrofilik gruplara sahiptir. Surfektan maddeler, hidrofilik gruplarına göre noniyonik, anyonik, katyonik ve amfoterik olarak sınıflara ayrılırlar.

Kuarterner amonyum bileşikler, hedefi hücre yüzeyindeki negatif yüklü gruplar olan katyonik deterjanlardır. Kuarterner amonyum bileşikler ilk kez 1916 yılında tanımlanmıştır fakat ticari olarak 1935'te kullanılmaya başlanmıştır [12]. Benzalkonyum klorit kimyasal sınıflandırmaya göre bir kuarterner amonyum bileşiktir. BNZ, zefiran ismi ile de bilinmektedir.



Şekil 2.3. Benzalkonyum kloritin kimyasal yapısı

Kuarternier amonyum bileşikleri hem antiseptik hem dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Gram negatif bakterilerin bir kısmının kuarternier amonyum bileşiklerine dirençli olması nedeniyle Centers for Disease Control and Prevention (CDC) antiseptik olarak kullanımını önermemektedir. Yüzey ve alet dezenfektanı olarak KAB kullanımı ise yaygındır [34].

Etkinliği Alkali pH'a bağımlı olarak artarken, organik madde ve deterjan varlığında oldukça azalır. Aşındırıcı değildirler ve toksik etkileri yok denecek kadar azdır [21, 34].

KAB yüksek konsantrasyonda mikrobisidal etki göstermesine rağmen, genellikle etkileri mikrobiyostatiktir. Gram- pozitif bakteriler üzerine daha fazla etkilidirler. Sporosidal etkisi yoktur, tuberküloid olarak ise aktivitesi zayıftır. Antifungal olarak ise fungisidal aktiviteden çok fungistatik aktivite gösterirler. Bakterilere ve mantarlara göre virüslere etkileri sınırlıdır. Zarflı virüsleri inaktive ederler fakat zarfsız virüslere karşı etkisizdirler. Genellikle, mikroorganizmaların benzalkonyum klorite karşı toleransı oldukça fazladır [21,34].

Kuarternier amonyum bileşikleri, genellikle membrandaki lipid yapısını bozarak veya hücre enzimlerini inaktive ederek membrana zarar verirler. BNZ, düşük konsantrasyonlarda membran geçirgenliğinde belirgin değişiklikler oluşturmada mayalarda Pasteur etkisini inhibe eder. Yüksek konsantrasyonlarda K⁺ iyon kaybına, hücre içeriğinin dışarı sızmasına ve hücre lizisine neden olurlar [8,32].

C. albicans ve özellikle *A. niger*, fenollere, alkollere ve kuarternier amonyum bileşiklerine *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S.aureus* gibi bakterilerden daha dirençlidir. Ayrıca, Kuarternier amonyum bileşiklerinin *C. albicans* üzerine etkisi zayıftır [8].

2.9.3. Sodyum hipoklorit (SHC)

Hipokloritler, en eski, en ucuz ve kullanımı en yaygın klor içeren dezenfektanlardır. Klorlu bileşiklerin sıvı formu % 5,25 (50000 ppm serbest klor) konsantrasyonda sodyum hipoklorit içeren çamaşır suyudur (NaOCl). Yere dökülen ve etrafa sıçrayan kanlar için CDC (Central of Disease Control and Prevention) 5000 ppm dezenfektan konsantrasyonunu önermektedir. Stok çamaşır suyu çözeltisinin (% 5,25) 1/10'luk dilüsyonu yaklaşık olarak 5000 ppm serbest klora eşittir. 1000 ppm klor içeren çamaşır suyu solüsyonu temiz bir yüzey için yeterlidir. Hipokloritler, özellikle yüzey dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır. Konsantrasyon ve temas sürelerine göre yüksek, orta ve düşük düzey dezenfeksiyon sağlamaktadırlar [10,20].

Sodyum hipokloritin mikrobisidal aktivitesi suda oluşan hipokloroz asidin (HOCl) oksidatif etkisine bağlıdır. Hipokloroz asidin çözünmesiyle hipoklorit iyonları (ClO^-) oluşur ve mikrobisidal aktivite azalır [18]. Hipokloritler mikroorganizmalara oldukça hızlı etki ederler. Yüksek ısıda, asidik pH'da ve içerdiği serbest klor miktarı arttıkça hipokloritlerin mikrobisidal etkisi artar. Antibakteriyel spektrumları oldukça geniştir. Hipokloritler, çok etkili fungisidal ajanlardır. Hücresel yapıların oksidasyonu ile bakteri ve mantarı parçalar. Zarflı ve zarfsız virüslere karşı virüsidal etkilidir ve yüksek konsantrasyonlarda (yaklaşık 2500 ppm) sporisidal aktivite gösterebilir [10].

Organik madde varlığında ve alkali pH'da klorun etkisi azalır ve bu nedenle inaktive olurlar. Bunun nedeni pH yükseldikçe hipokloroz asidin çözünürlüğü artar ve hipoklorit iyonlarının fazlalaşması SHC etkisini azaltır. Çamaşır suyunun etkinliği pH asidikleştikçe artış gösterir. Dayanıksız, tahriş edici ve aşındırıcı olmaları dezavantajları arasında yer alır. Toksik etkileri çok fazla değildir, fakat amonyak ve asitlerle reaksiyona girerek toksik klor gazı oluşturmaları [18,20].

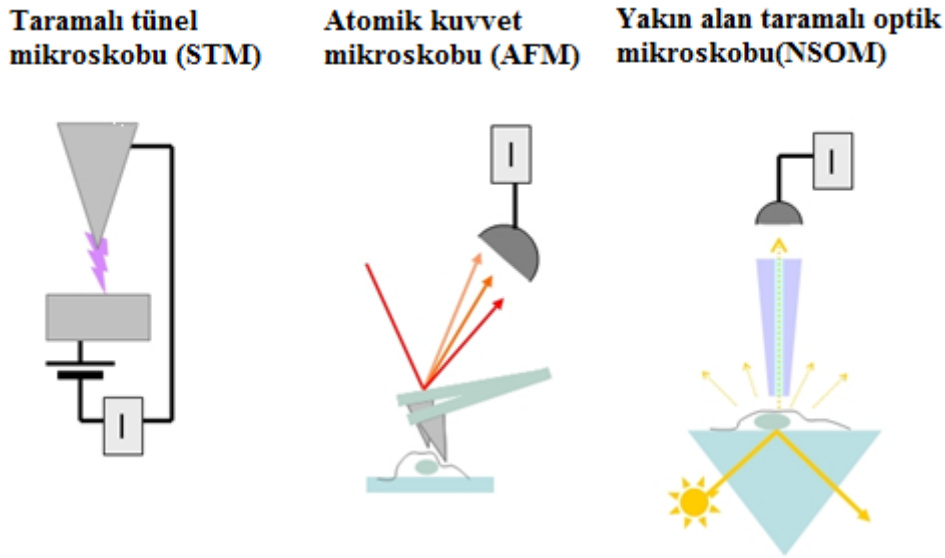
2.10. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

Atomik kuvvet mikroskobu bir çeşit taramalı prob mikroskobudur (Scanning probe microscopy, SPM). Prob mikroskoplarında, diğer mikroskoplardan farklı olarak elektron yada ışık demeti kullanmak yerine prob kullanılır. Diğer taramalı prob mikroskoplarına benzer şekilde, AFM örnek yüzeyini prob ile tarar ve proba yüzey arasındaki kuvvet

değişikliklerini ölçebilir. Bu çeşit mikroskoplar yüzeyin üç boyutlu (3D) haritalarını oluşturabilirler [42, 44].

AFM dışındaki taramalı prob mikroskopları (SPM):

- Taramalı tünel mikroskobu (Scanning tunnelling microscopy, STM)
- Yakın alan taramalı optik mikroskop (Near-field scanning optical microscopy, NSOM)



Şekil 2.4. Taramalı prob mikroskopları (Scanning Prob Microscopes,SPM) [41,46]

Taramalı prob mikroskoplarının en gelişmiş ve en yaygın kullanılan versiyonu atomik kuvvet mikroskobudur. Prop mikroskoplarının kökeni taramalı tünel mikroskobuna dayanır. Taramalı tünel mikroskobu, 1982' de Binning ve Roher tarafından icat edilmiş ve mucitleri fizik alanında Nobel ödülüne layık görülmüştür [42]. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ise Binning, Quate ve Gerber tarafından 1986'da icat edilmiştir [36-38].

Taramalı tünel mikroskobu (STM) sadece iletken ve yarı iletken yüzeylerde görüntü verebilirken, atomik kuvvet mikroskobu hemen hemen her türlü yüzeyi nano ölçülerde görüntüleyebilen gelişmiş bir STM versiyonudur [42].

2.10.1. Atomik kuvvet mikroskobunun genel kullanım amacı ve uygulama alanları

Atomik kuvvet mikroskobu, hücre yüzeyini yüksek atomik çözünürlükte görüntüleyebilen üç boyutlu topografik yakın alan tekniğidir. AFM, nano-newton ölçüde kuvveti ölçebilir. [13]. Optik tekniklerden 1000 kat daha yüksek çözünürlüğe sahiptir. Birkaç mikrondan 10 angstrom çözünürlüğe kadar görüntüleme yapabilir [13,38]. Atomik kuvvet mikroskobu modern yüzey karakterizasyonu teknikleri arasında en üstün olanıdır.

Atomik kuvvet mikroskobunun genel kullanım amacı

- Nano boyutta ölçüm (boy,en, yükseklik)
- İki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) yüzey görüntüsü
- Yüzey pürüzlülüğünün tespiti.

AFM örnek yüzeyinin görüntülenmesinin yanı sıra yüzeyin çeşitli özelliklerinin de tespit edilmesini sağlar. Atomik kuvvet mikroskobu ile,

- Faz değişiklikleri
- Sertlik
- Elektrostatik ve manyetik özellikler
- Viskoelastik özellikler
- Sürtünme kuvveti
- Pürüzlülük
- Adezyon kuvvetleri de saptanabilmektedir [37,42].

Atomik kuvvet mikroskobu herhangi bir örnek yüzeyini sıvı veya hava ortamında analiz edebilir [37,42]. AFM için örnek hazırlık aşaması diğer mikroskoplara göre daha kolaydır. Mika, cam veya altın kaplama sert bir tabaka üzerinde hemen hemen bütün numune yüzeyleri incelenebilir [39,42].

AFM ile görüntüleme yapılabilen yüzeyler :

- İnce ve kalın kaplamalar
- Seramikler
- Kompozitler

- Camlar
- Sentetik ve biyolojik membranlar
- Metaller
- Polimerler
- Yarı iletkenler
- Yalıtkanlar
- Kristal ya da amorf malzemelerin sert yüzeyleri
- Polimerik yumuşak yüzeyler
- Kolloidal nano parçacıklar
- Fiber malzemeler [13,42].

Atomik kuvvet mikroskobu çok geniş uygulama alanına sahiptir. Uygulama alanları arasında;

- Yaşam ve Sağlık Bilimleri
- Fizik
- Malzeme Bilimi
- Polimer Bilimi
- Nanolitografi
- Nano-Biyoteknoloji
- Elektronik
- Telekomünikasyon
- Kimya
- Otomotiv
- Uzay-Havacılık
- Enerji
- Tekstil
- Boya ve mürekkep endüstrisi sayılabilir.

Biyolojik araştırmalarda AFM uygulamaları

Yaşam ve sağlık bilimlerinde AFM farmakoloji, fizyoloji, biyoteknoloji, mikrobiyoloji, enzimoloji, dentoloji, farmakoloji, moleküler biyoloji, biyofizik, analitik ve organik kimya gibi birçok alanda kullanılmaktadır [42,43].

Atomik kuvvet mikroskobu biyolojik materyalleri görüntülemeye özellikle son on yılda yaygın şekilde kullanılmaktadır [39,42]. AFM'nin tercih edilmesi fiziksel koşullara yakın tek hücre düzeyinde yüksek çözünürlükte görüntü verebilme özelliğinden kaynaklanmaktadır [37,45]. Taramalı elektron mikroskobu (SEM), biyolojik örnek yüzeylerinin yüksek çözünürlükte görüntülenmesinde uzun süredir kullanılmaktadır. Örnek hazırlama esnasında SEM analizi için fiksasyon, dehidrasyon ve kaplama gibi hazırlık aşamalarında hücreler ölür, AFM örnek hazırlık sürecinde hücrelere zarar vermemektedir. Bu sayede hücrelerin canlı olarak görüntülenmesine olanak sağlar ve daha gerçekçi sonuçlar elde edilir [43,44].

- Biyomoleküller
- Kan hücreleri
- Nükleik asitler
- Canlı ve ölü hücreler
- Bakteriler ve mantarlar
- Virüsler
- Membran proteinleri ve iyon kanalları
- Mikrofilamentler
- Kanseri hücreleri

AFM ile analiz edilen biyolojik yapıların bir kısmıdır [37,42].

İstenildiği takdirde floresan mikroskobu, taramalı konfokal lazer mikroskobu (SCLM), Raman spektroskopisi gibi çeşitli optik ve spektroskopik teknikler atomik kuvvet mikroskobuna entegre edilebilir [40]. Tipin modifiye edilmesi ile atomik kuvvet mikroskobunun farklı uygulama yöntemleri de mevcuttur.

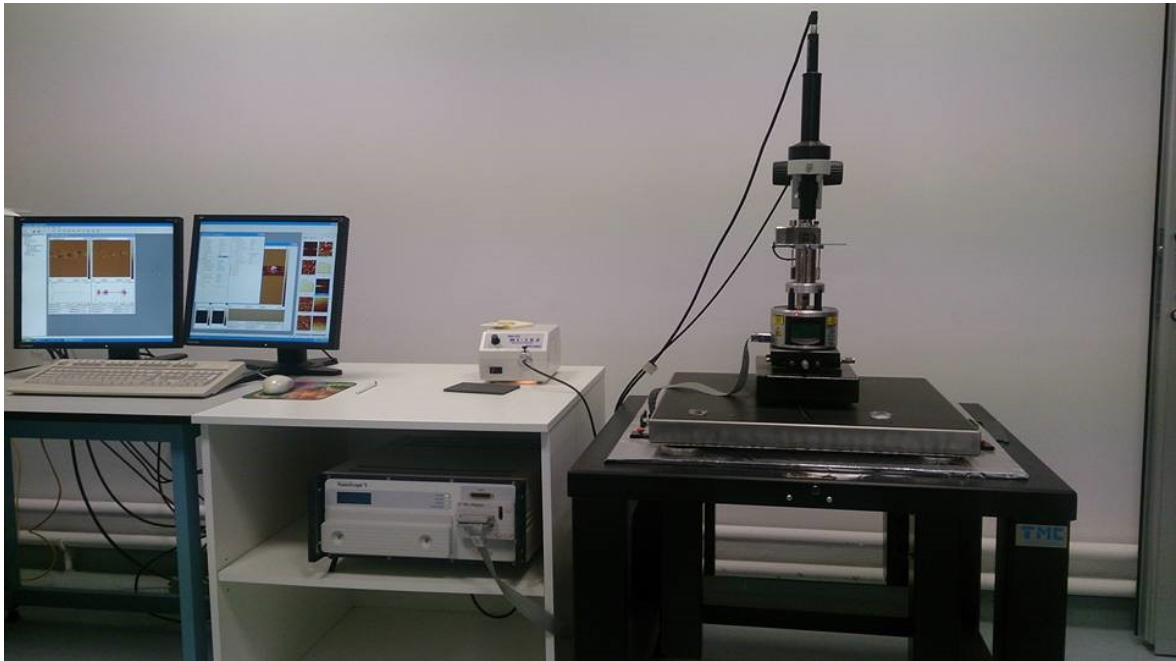
Atomik kuvvet mikroskobunun farklı uygulanma yöntemleri:

- Manyetik kuvvet mikroskobu (MFM), numune yüzeyindeki manyetik alanların ölçülmesinde kullanılır.
- Elektrostatik kuvvet mikroskobu (EFM), yüzeyin elektrostatik özelliklerini görüntüler.
- Kimyasal kuvvet mikroskobu (CFM), yüzeyin kimyasal özelliklerinin tespitini sağlar.

- Lateral kuvvet mikroskobu (LFM), yüzeyin sürtünme özelliğindeki değişimden yararlanarak yüzey kompozisyonunu belirler [13,40].

2.10.2. Atomik kuvvet mikroskobunun çalışma mekanizması

Atomik kuvvet mikroskobunun mekanizması temelde örneğin incelendiği mikroskop ve mikroskoptan gelen verilerin görüntülendiği işletim sisteminden oluşmaktadır (Resim 2.1). Atomik kuvvet mikroskobu profilometre gibi çalışır, örnek yüzeyini x, y ve z koordinatlarında tarar [40,43]. Atomik kuvvet mikroskobunun temel mekanizması prob görevi gören tip, tipin bağlı bulunduğu manivela, diyot lazer ve pozisyon duyarlı fotodiyot dedektörden meydana gelmektedir. AFM'nin genel çalışma prensibi, prob ve numune arasındaki Van der Waals kuvvetlerinin saptanması temeline dayanır [41,42].

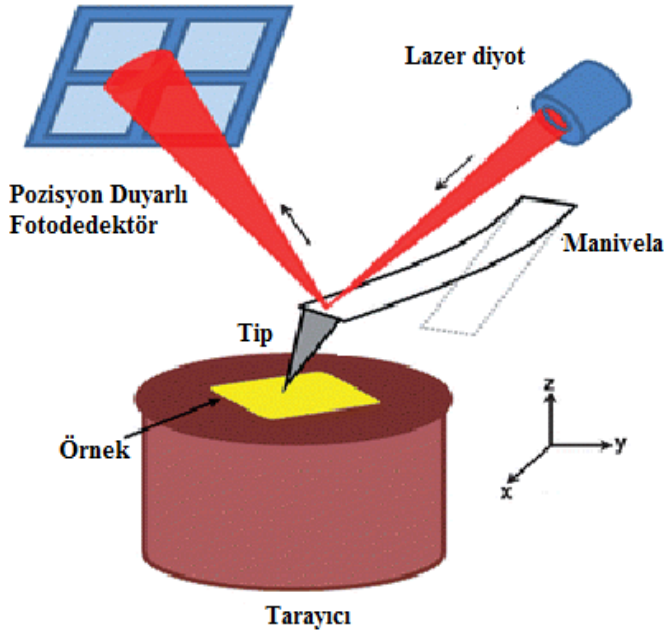


Resim 2.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

AFM, yüzey özelliklerini incelemek için birçok yolla modifiye edilebilen bir proba sahiptir. Prob, AFM tip ya da AFM sensör olarak bilinir. Tip, silikon (Si) veya silikon nitritten (Si_3N_4) üretilmiş mikro boyutlarda uzun, ince, sivri ve dayanıklı bir malzemedir [37,42]. Normal, süper ve ultra keskin gibi birçok çeşidi mevcuttur [45]. Ayrıca, prob çeşitli materyallerle kaplanarak kimyasal kuvvet mikroskobu (CFM) ve manyetik kuvvet mikroskobu (MFM) gibi farklı AFM uygulamaları elde edilebilir. Modifiye tipler ile

ligand-reseptör, antijen-antikör, ilaç-hücre etkileşimleri gibi biyolojik moleküller arasındaki etkileşim de ölçülebilir [45].

Prob, esnek bir manivela'nın ucuna bağlıdır. Manivela 100-200 μm uzunluğunda, 0,5-2 mikron kalınlığındadır [40]. Optik sistem olarak kullanılan lazer ışını, manivela üzerine gönderilir ve manivela üzerinden yansıyan lazer ışını pozisyon duyarlı fotodiyot detektörler tarafından algılanır. Tarama esnasında prob ve yüzey arasındaki çok küçük kuvvetler manivela'nın sapmasına neden olur. Buna manivela sertliği denir ve Hooke yasaları ile ölçülebilir. Fotodiyot dedektör gelen ışını ve pozisyon değişikliklerini elektriksel titreşimlere dönüştürerek bilgisayara gönderir. Sapma görsel olarak kaydedilir ve gerçek zamanlı olarak bilgisayar üzerinde görüntülenebilir [13,40-44].



Şekil 2.5. Atomik kuvvet mikroskobunun çalışma prensibi [47].

2.10.3. Atomik kuvvet mikroskobu inceleme yöntemleri

AFM inceleme yöntemleri temelde temaslı yöntem, temassız yöntem ve vurma yöntemi olarak üç grupta sınıflandırılır [13,41].

Temaslı yöntem

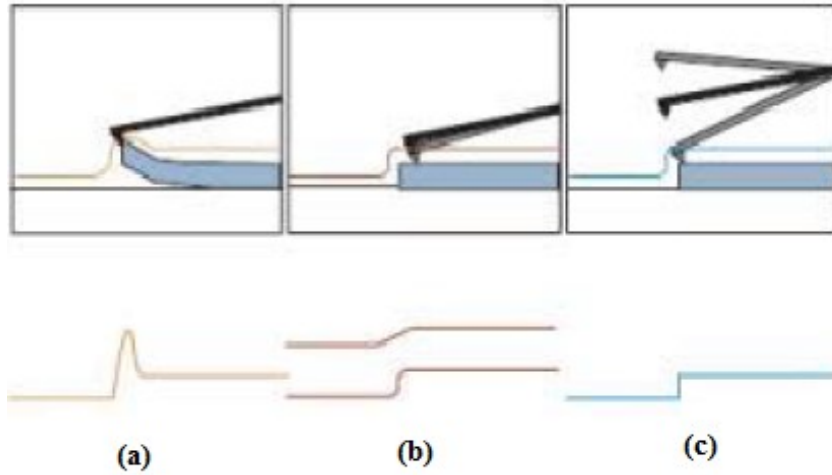
Bu inceleme yönteminde tip ile örnek yüzeyi tarama boyunca sürekli temas halindedir. Bu yöntem daha çok sert ve düz yüzeylerin incelenmesi için tercih edilir. Temaslı yöntem yüksek çözünürlüklü görüntü elde edilmesi, hızlı tarama sağlaması, sürtünme kuvvetinin, yüzey sertliğinin ve esnekliğinin ölçülebilmesi açısından avantajlıdır, fakat görüntü analizi yapılırken prob örnek yüzeyine zarar verebilir. Bu sebeple aynı örnek üzerinde tekrar inceleme yapılamaz [37, 41].

Temassız yöntem

Bu analiz yönteminde tip ile örnek yüzeyi birbirine temas etmez. Prob ile yüzey arasındaki mesafe yaklaşık olarak 10 nanometreye kadar çıkabilir. Çok yumuşak yüzeyler için bu yöntem tercih edilir. Temassız yöntem örnek yüzeyine zarar vermez fakat görüntü çözünürlüğü diğer yöntemlere göre daha düşüktür [13,38].

Vurma yöntemi

Vurma yönteminde örnek ile yüzey arasında aralıklı temas söz konusudur, tip örnek yüzeyi üzerinden temassız yöntemle göre daha kısa bir mesafeden salınarak tarama yapar. Vurma yöntemi, temaslı ve temassız yöntem arasındaki inceleme yöntemidir. Bu yöntem ile en iyi çözünürlüklü görüntü elde edilir fakat tarama oldukça yavaş ilerler. Örneğe minimal düzeyde zarar vermesinden dolayı da avantajlıdır. Vurma yöntemi ile faz görüntüsü de elde edilebilir. Yüzeye zayıf bağlanan ve yumuşak yüzey yapısına sahip olan örnekler vurma yöntemi ile incelenir. Biyolojik örneklerin incelenmesinde bu yöntem tercih edilir [13,38].



Şekil 2.6. AFM çalışma yöntemleri (a) temaslı yöntem (b) temassız yöntem (c) vurmali yöntem [48]

2.10.4. Atomik kuvvet mikroskobunun avantajları ve dezavantajları

Optik ve elektron mikroskopları biyolojik örneklerin iki boyutlu görüntülenmesinde uzun süredir kullanılmaktadır. Optik mikroskobun ışık kaynağı nedeniyle büyütme oranı ve çözünürlüğü diğerlerine göre sınırlıdır. Taramalı elektron mikroskobunun çözünürlüğü optik mikroskoptan oldukça fazladır. Ancak, SEM'de örnek hazırlık aşamasının zorluğu, canlı hücre görüntülenememesi gibi sebeplerden dolayı AFM diğer mikroskoplara göre hücre yüzeyinin incelenmesinde daha çok tercih edilmektedir. Ayrıca, bu mikroskoplar örneğin yükseklik ölçümünü veren z ekseninde ölçüm yapamazlar. AFM'nin büyütme oranı elektron mikroskobuyla karşılaştırıldığında oldukça fazladır ve AFM hem yatay (x-y eksen) hem de dikey (z eksen) ekseninde ölçüm yapabilir. SEM için en iyi çözünürlük 4 nm iken, AFM için 0,3 nanometredir [38,49].

Çizelge 2.4. AFM ile diğer mikroskopların karşılaştırılması [38,49].

	Optik Mikroskop	SEM	AFM
İnceleme ortamı	Hava/Sıvı	Vakum	Hava/Sıvı/Vakum
Örnek tipi	Katı/Sıvı	Katı	Katı/Sıvı
Örnek Hazırlığı	Kolay, kısa süreli	Zor, uzun süreli	Kolay, kısa süreli
Çözünürlük	170-500 nm	<0,2 nm (x, y eksen)	<1 nm (x, y akseni) <0,1 nm (z akseni)
Büyütme Aralığı	100X	20-60000X	3000-250000X

Çizelge 2.5. Atomik kuvvet mikroskopunun avantajları ve dezavantajları [38,42].

AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
- Kolay numune hazırlama olanağı vardır. - Fiksasyon,dehidrasyon,kaplama aşamaları yoktur. - Doğru yükseklik bilgisi verir. - Örnekler hava,vakum ve sıvı ortamda analiz edilebilir. - Farklı sıcaklık,PH,buffer gibi çeşitli ortamlarda analiz imkanı sunar. - Canlı hücre analizi ve dinamik sürecin görüntülenmesine imkan verir. - Numune iletken olmak zorunda değildir. - Yüksek çözünürlükte 3D görüntüleme yapar. - Örneğin mekanik özelliklerini ölçebilir. (Sertlik, sürtünme, elastikiyet vs.) - Faz görüntüsü verebilir. - Tip modifiye edilebilir. - Diğer mikroskoplara göre nispeten daha ucuzdur.	- Sınırlı yükseklik ölçümü yapar. - Sınırlı büyütme aralığında analiz yapabilir. - Veri, tip ile bağımlı değişkenlik gösterebilir. - Görüntüleme esnasında tip veya örnek zarar görebilir. - Sadece yüzey görüntüsü verir. - Görüntü analizi uzun süre alır. - Tek bir alan için görüntüleme yaklaşık beş dakika sürer.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneğin Hazırlanması

Çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikoloji Laboratuvarında -80°C’de muhafaza edilen ve biyosid çalışmalarını düzenleyen CEN tarafından kalite kontrol kökeni olarak önerilen standart suş *C.albicans* ATCC 10231 kullanılmıştır. Çimlenme borusu testi ve ID32 C (bioMerieux, Fransa) kiti kullanılarak suşun tür düzeyinde tanısı teyit edilmiştir.

C.albicans ATCC 10231 suşu Sabouraud dekstrozu agara (SDA) ekilmiş ve inkübasyon için 24 saat 37°C’de etüvde bekletilmiştir.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Kullanılan cihaz ve laboratuvar malzemeleri

- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Derin dondurucu -80°C (Sanyo, Japonya)
- Etüv (Elektro-mag, Türkiye)
- Otoklav (Sanyo, Japonya)
- Çalkalayıcı inkübatör (Biosan, Letonya)
- Pastör fırını (Nüve, Türkiye)
- Santrifüj cihazı (BOECO, Almanya)
- Mikrosantrifüj cihazı (Beckman Coulter, Almanya)
- McFarland cihazı (Dade Behring MicroScan Turbidity Mater)
- Hassas terazi (Kern, Almanya)
- Mikropipetler ve uçları (Beta pette™ , ABD)
- Otomatik pipet seti (Labmate,Türkiye)
- U tabanlı mikroplak (LP italiana, İtalya)
- Çalkalayıcı (vortex)
- Petriler, endorflar, cam ve plastik tüpler, lamalar, özeler

3.2.2. Kullanılan besiyerleri

- Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) Besiyeri (Fluka Biochemica, İsviçre)
- Sabouraud Dekstroz Broth (SDB) Besiyeri (Merck, Almanya)

3.2.3. Kullanılan kimyasal maddeler

- Klorhekzidin diglukonat solüsyonu (Sigma, İspanya)
- Benzalkonyum klorit (Sigma, Danimarka)
- Sodyum hipoklorit (Sigma, ABD)
- Agar (Himedia, Hindistan)
- Metilen mavisi (Merck, Almanya)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Besiyerlerinin hazırlanması

Sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyerinin hazırlanması

Besiyerinin içeriği:

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

Toz besiyerinden 47 g tartılmış ve üzerine 1 L distile su eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C’de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir. Steril petri kaplarına 25’er ml dökülerek katılaşmaya kadar bekletilmiş ve katı besiyerleri kullanılıncaya kadar +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.

Sabouraud dekstroz broth besiyerinin hazırlanması

Besiyerinin içeriği:

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

Toz besiyerinden 30 g tartılmış ve üzerine 1 L distile su eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C’de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir. Sıvı besiyeri kullanılıncaya kadar +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.

3.3.2. Biyosidlerin minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimal fungisidal konsantrasyon (MFK) değerlerinin belirlenmesi

C. albicans ATCC 10231 kökeninin klorhekzidin (CHX), benzalkonyum klorit (BNZ) ve sodyum hipoklorit (SHC) biyosidlerinin her biri için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ve minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) değerleri belirlenmiştir.

Stok biyosid solüsyonların hazırlanması

Benzalkonyumun 256 miligram/litre (mg/L) stok konsantrasyonunun hazırlanması için toz halde bulunan benzalkonyum kloritden (Sigma, Danimarka) 0,0256 gram tartılmış ve 100 mililitre distile suda çözülerek stok solüsyonlar elde edilmiştir.

Klorhekzidinin 64 mg/L stok konsantrasyonunun hazırlanması için sıvı halde bulunan %20’lik klorhekzidin diglukonattan (1,06 gr/ml) (Sigma, İspanya) 0,0015 ml alınarak, distile su ile 50 mililitreye tamamlanmıştır.

Sodyum hipokloritin 65536 mg/L stok konsantrasyonunun hazırlanması için solüsyon halindeki %10-15’lik sodyum hipokloritten (Sigma-ABD) 18 ml alınarak, distile su ile 100 mililitreye tamamlanmıştır. Stok solüsyonlar kullanılıncaya kadar +4°C’de saklanmıştır.

3.3.3. Minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerlerinin mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmesi

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından mayalar için standardize edilen mikrodilüsyon yönteminde bazı değişikliklerden sonra, standart suşun seçilen biyosidlere duyarlılıkları incelenmiştir.

Mikrodilüsyon yönteminde, Sabouraud dekstrozu sıvı besiyeri (SDB) kullanılmıştır. 96 kuyucuklu U-tabanlı plağın bütün kuyucuklarına 100 µl Sabouraud dekstrozu besiyeri eklenmiştir. Biyosidlerin stok solüsyonlarından 100 µl alınarak mikroplağın ilk

kuyucuklarına eklenmiş ve seri dilüsyon yapılmıştır. Bu sayede CHX için 0,0625-32 mg/L aralığındaki konsantrasyonlar, BNZ için 0,125-128 mg/L aralığındaki konsantrasyonlar ve SHC için 64-32768 mg/L aralığındaki konsantrasyonlar elde edilmiştir.

Maya süspansiyonu 0,5 Mc Farland (1×10^6 hücre/ml) bulanıklığında hazırlanmıştır ve süspansiyondan negatif kontrol kuyucukları hariç bütün kuyucuklara 10 µl dağıtılmıştır. Mikroplak içerisinde negatif kontrol kuyucukları sadece besiyeri içerirken, pozitif kontrol kuyucukları besiyeri ve maya süspansiyonu içermektedir. Mikroplak 37°C etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. Bulanıklığın gözle görülmediği ilk kuyucuk en düşük biyosid konsantrasyonu MİK olarak belirlenmiştir.

3.3.4. Minimal fungisidal konsantrasyon (MFK) değerlerinin belirlenmesi

Mikroplakta gözle görülür üremenin olmadığı MİK kuyucuğundan ve bulanıklık olmayan önceki iki kuyucuktan 10 µl alınarak Sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyerine pasaj yapılmıştır ve 37°C etüvde 24 saat inkübasyon için bırakılmıştır. Katı besiyerinde üremenin görülmediği en düşük biyosid konsantrasyonu MFK olarak belirlenmiştir.

3.3.5. Atomik kuvvet mikroskobu için örnek hazırlanması

Atomik kuvvet mikroskop analizi ODTÜ merkez laboratuvarında bulunan Veeco marka NanoScope V AFM cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Kantitatif veri analizi ise NanoScope işletim sistemi ile yapılmıştır.

Makrodilüsyon için steril tüpler kullanılmıştır. Bütün tüplere 1 ml Sabouraud Dekstroz sıvı besiyeri dağıtılmıştır. İlk tüpe stok biyosid ve antifungal çözeltilerinden 1 ml eklenmiş ve seri sulandırımı yapılmıştır. Klorhekzidin, benzalkonyum klorit, sodyum hipoklorit ve pozitif kontrol grubu olan amfoterisin B ve nistatinin her biri için ayrı ayrı bu işlem uygulanmıştır. Her sulandırımın son hacmi 1 mililitredir. Her biyosid ve antifungal için MİK, 2xMİK ve 4xMİK konsantrasyonlarındaki tüpler seçilmiş ve bu tüplere 0,5 Mc Farland (1×10^6 hücre/ml) bulanıklığında hazırlanan maya süspansiyonundan 100 µl eklenmiştir. Biyosid içermeyen sadece sıvı besiyeri içeren tüp negatif kontrol tüpü, sıvı besiyeri ve maya inokulumu içeren tüp pozitif kontrol tüpü olarak kullanılmıştır. Tüm

örnekler inkübasyon için 8, 12 ve 24 saat süreyle 37°C'de 180 rpm'da çalkalayıcı inkübatöre konulmuştur.

Farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde biyosidlere maruz bırakılan maya hücreleri 9000 xg devirde 10 dakika santrifüj edilmiş ve oluşan çökelek iki kez steril distile su ile yıkanmıştır.

Atomik kuvvet mikroskobu analizi için, 1x1 cm² boyutlarında kesilmiş lam parçaları kullanılmadan önce saf etil alkol ile silinmiş ve pastör fırınında 200°C 'de 120 dakika steril edilmiştir. 8, 12 ve 24 saat inkübasyon sonrasında süspansiyonların her birinden 10 µl alınarak 1x1 cm² lam parçaları üzerine damlatılmıştır ve cam yüzey üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Lam parçaları bek alevi üzerinden birkaç kez geçirilerek süspansiyonlar cam üzerine fiks edilmiştir ve metilen mavisi ile boyanmıştır. Steril distile su ile yıkandıktan sonra, oda sıcaklığında bir gece boyunca kurutulmuştur. Tamamen kuru olduğu tespit edilen preparatlar atomik kuvvet mikroskobu (Nano scope V, Veeco, ABD) ile incelenmiştir. AFM görüntü analizi silikon tip kullanılarak vurma yöntemi ile hava ortamında gerçekleştirilmiştir ve tarama hızı 1 Hz'dir.

AFM analizi sırasında örnek yüzeyinden rastgele seçilen 20x20 µm², 10x10 µm², 4x4 µm² ve 500x500 nm² alanlar incelenmiştir. Bu alanların iki boyutlu, üç boyutlu ve faz ekranı görüntüleri elde edilmiştir. Her görüntü için görüntü çözünürlüğü 256x256 pikseldir. Hücrelerin eni, boyu ve yüksekliği ölçülmüştür. Hücre yüzeyinde seçilen alanlarda yüzey pürüzlülüğü ölçülmüştür. Biyosidlerle muamele edilen hücreler ile kontrol hücrelerinin AFM görüntüleri ve kantitatif analizleri karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Mikrodilüsyon Sonuçları

Klorheksidin, benzalkonyum klorit ve sodyum hipoklorit biyosidleri ve pozitif kontrol olarak kullanılan nistatin ve amfoterisin B antifungal ilaçların herbiri için ayrı ayrı olmak üzere *C. albicans* ATCC 10231 referans kökeninin Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri ve Minimum Fungisidal Konsantrasyon (MFK) değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler çizelge 4.1' de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Kullanılan biyosidler ve antifungal ilaçlar için standart suşa ait MİK ve MFK değerleri

Biyosid/ Antifungal	MİK	MFK
Klorheksidin (CHX)	2 mg/L	4 mg/L
Benzalkonyum klorit (BNZ)	4 mg/L	8 mg/L
Sodyum hipoklorit (SHC)	2048 mg/L	2048 mg/L
Nistatin (NST)	0,25 µg/mL	0,5 µg/mL
Amfoterisin B (AMB)	<0,03 µg/mL	0,125 µg/mL

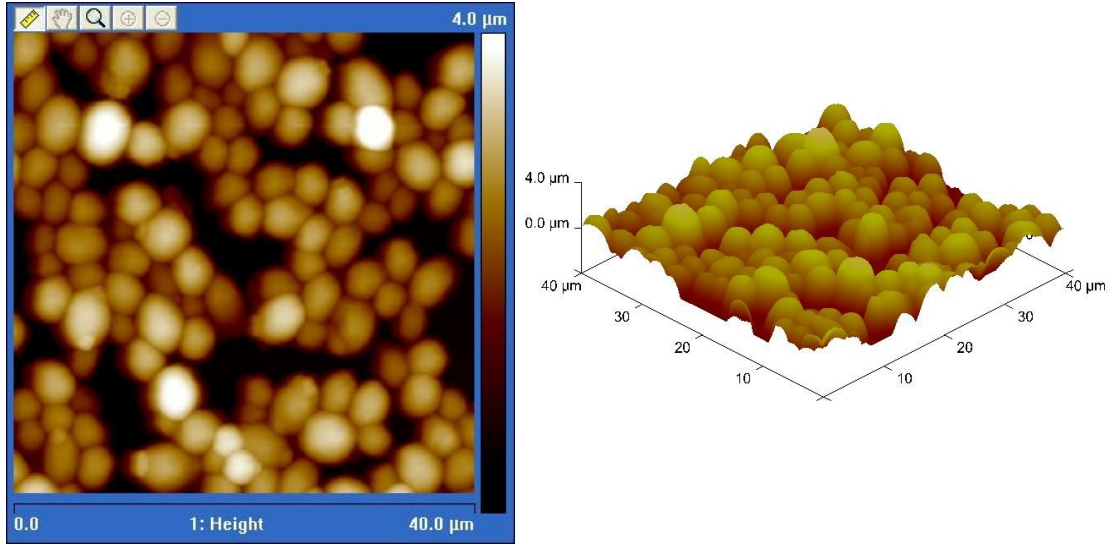
4.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Görüntüleri

Candida albicans ATCC 10231 suşu üzerinde klorheksidin, benzalkonyum klorit ve sodyum hipoklorit biyosidlerinin herbiri için MİK, 2xMİK ve 4xMİK olmak üzere üç farklı konsantrasyon 8, 12 ve 24 saat uygulanmıştır. Deneyde nistatin (32 µg/mL) ve amfoterisin B (16 µg/mL) ilaçları pozitif kontrol (PK) ve ilaç içermeyen maya süspansiyonu negatif kontrol (NK) olarak kullanılmıştır. Bağımsız olarak yapılan AFM ile görüntüleme tekrarlarının sonuçları uyumludur.

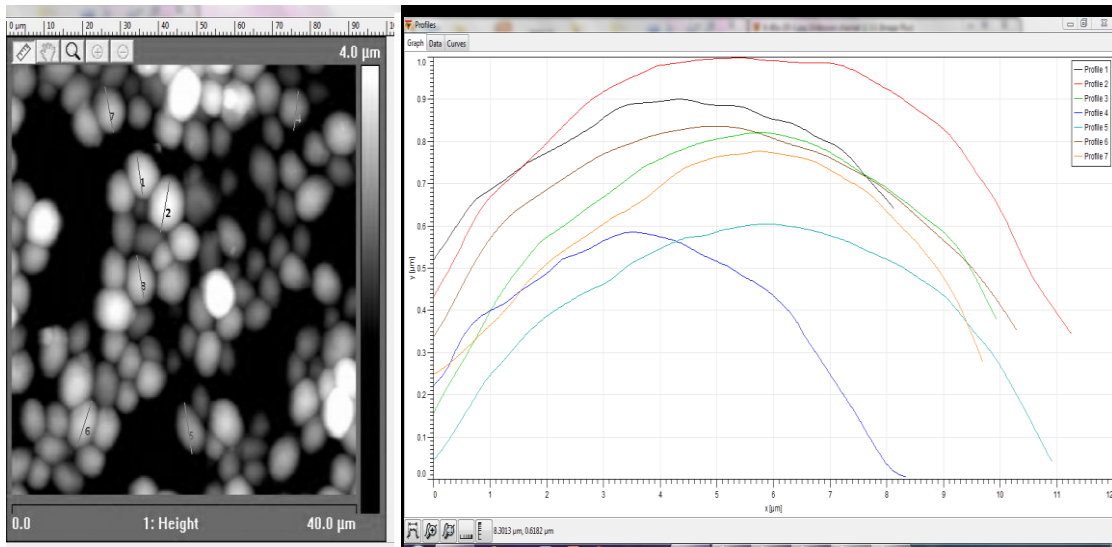
4.2.1. Negatif kontrol hücrelerinin AFM sonuçları

Çalışmamızda ilaç içermeyen sadece besiyerinin bulunduğu ortamda 8, 12 ve 24 saat inkübe edilen hücrelerin AFM görüntüleri, biyosid ile muamele edilen hücrelerin görüntülerindeki etkilerin yorumlanabilmesi açısından negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca, negatif kontrol hücrelerinin AFM ile analizi sonucunda elde edilen hücre boyutu, pürüzlülük, yüzey alan değişikliği gibi kantitatif verileri, biyoside maruz bırakılan

hücrelerin verileri ile karşılaştırılırken standart veri olarak kullanılmıştır. Teorik kitaplarda *Candida* hücre boyutu için yaklaşık 10 μm denmektedir. Ancak çalışmamızda AFM ile görüntüleme öncesi hücreler kurutulduğu için 10 μm 'lik boyutun küçüldüğü düşünülmektedir.



Resim 4.1. Kontrol hücrelerinin 40x40 μm^2 alandaki iki boyutlu ve üç boyutlu AFM görüntüsü



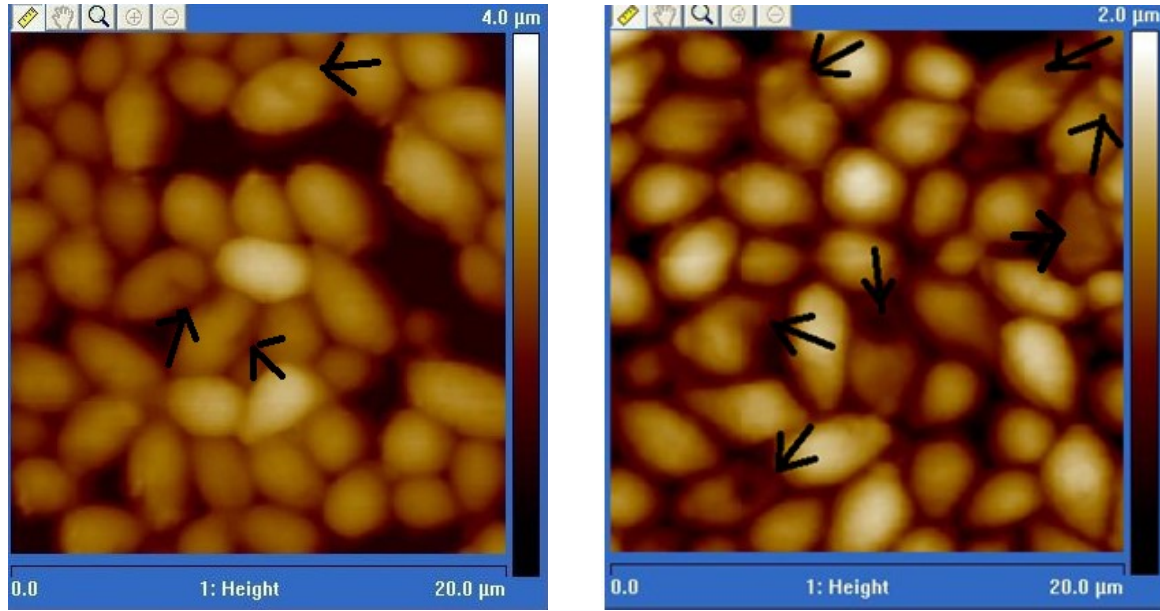
Resim 4.2. Negatif kontrol hücrelerinin yüzey profilleri

4.2.2. Pozitif kontrol hücrelerinin AFM sonuçları

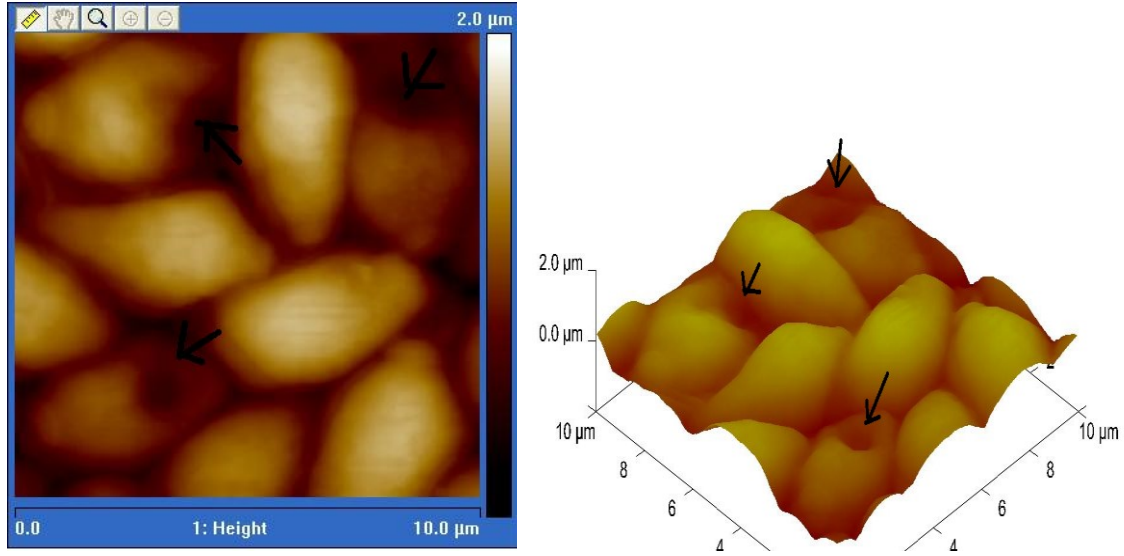
Çalışmamızda polyen grubu antifungaller olan nistatin ve amfoterisin B, biyosid ile muamele edilen hücrelerde morfolojik değişikliklerinin değerlendirilmesi açısından pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Hücre yüzeyi üzerine antifungallerin ve biyosidlerin etki benzerlikleri, AFM görüntüleri ve kantitatif analiz verileri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Amfoterisin B'nin, MİK konsantrasyonunda 8, 12 ve 24 saat etkisi görüntü olarak negatif kontrol hücreleri ile benzerdir ve yüzeyde belirgin herhangi bir değişiklik görülmemektedir. Pürüzlülük ve z eksen değeri de bu sonucu desteklemektedir.

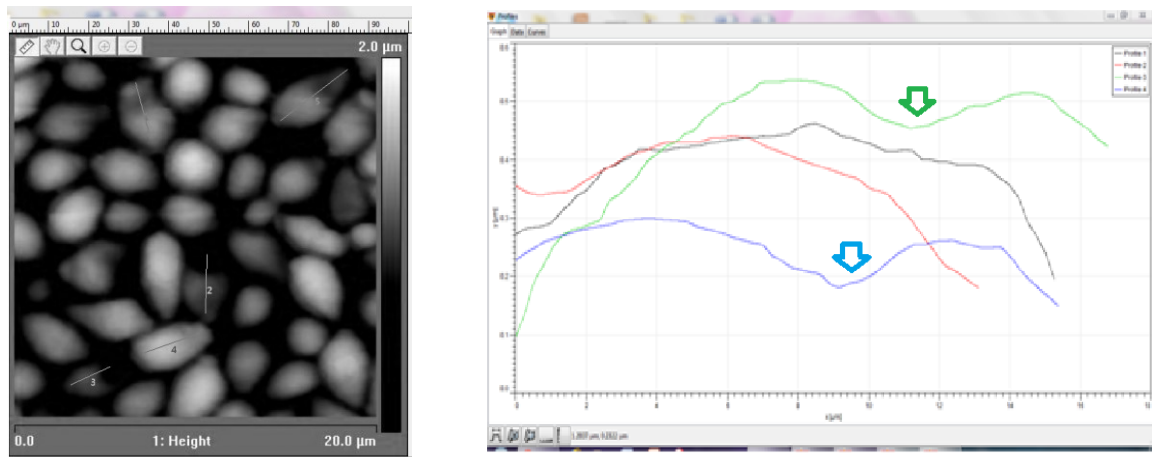
AMB'nin 2xMİK konsantrasyonuna 8 ve 12 saat maruz bırakılan hücrelerin yüzeyindeki çökme net olarak görülmektedir. Resim 4.3'te temas süresi artıkça çökmenin arttığı ve por oluşumunun başladığı gözlenmektedir.



Resim 4.3. 2xMİK konsantrasyonunda amfoterisin B'nin 8 saat (solda) ve 12 saat (sağda) temas sürelerinde hücreler üzerine etkisi

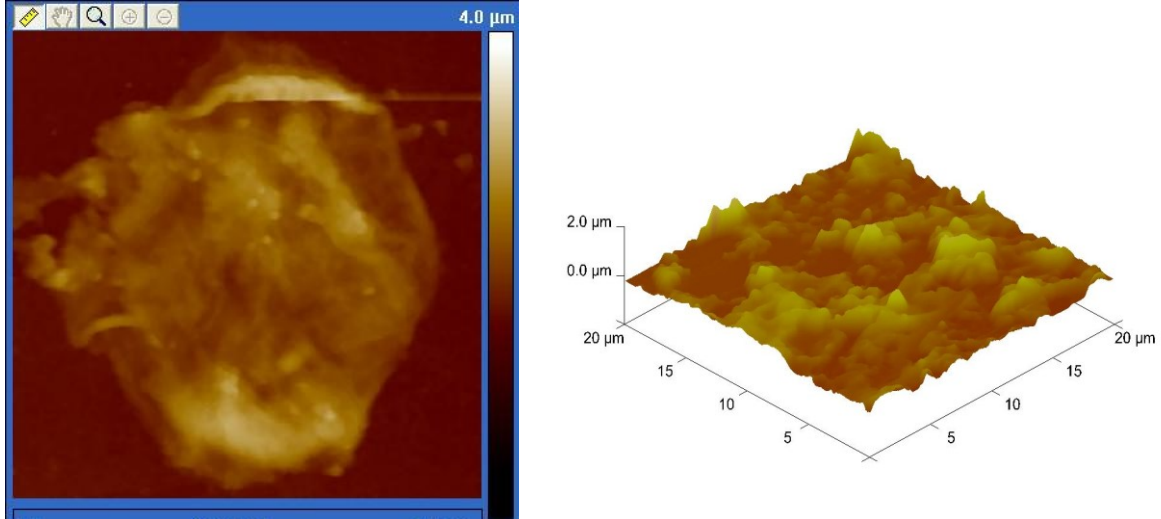


Resim 4.4. 2xMİK konsantrasyonundaki AMB'nin 12. saatte por oluşturma etkisinin 10x10 μm^2 alanda 2D ve 3D görüntüsü



Resim 4.5. 2xMİK konsantrasyonunda AMB ile karşılaşan hücrelerde çukur oluşumunun profil analizi ile gösterilmesi

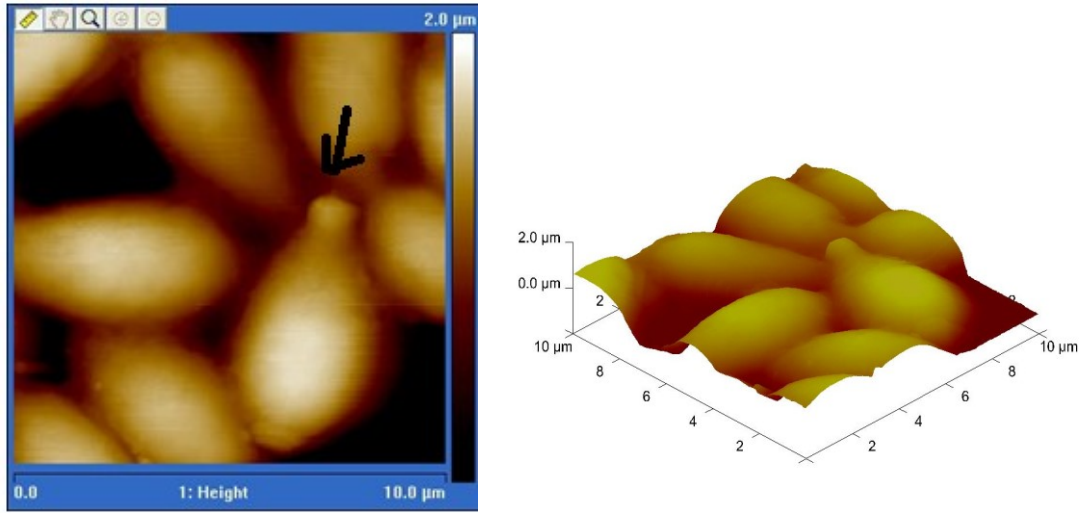
2xMİK konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılan hücreler ile 4xMİK konsantrasyonuna tüm saat dilimlerinde maruz bırakılan hücreler parçalanmış ve hücre içerikleri boşalmıştır. Nistatin ise tüm konsantrasyonlarda ve tüm zaman dilimlerinde hücre lizisine neden olmuştur.



Resim 4.6. Nistatin (solda) ve amfoterisin B (sağda) ile karşılaşmış *C. albicans*'ın hücre lizisi görüntüleri

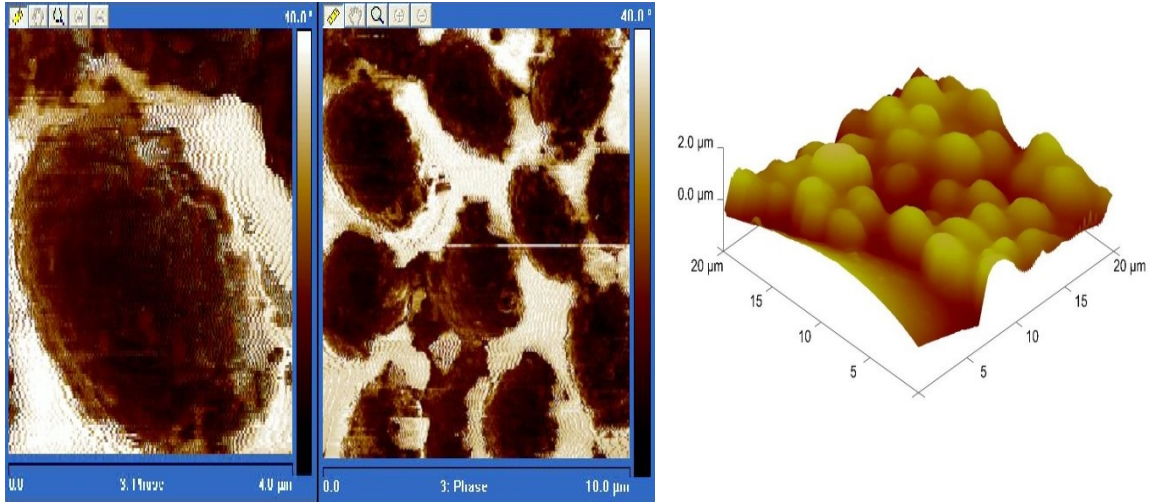
4.2.3. Klorhekzidin ile karşılaşmış *C. albicans* hücreleri için AFM sonuçları

Klorhekzidinin 8 saat öncesindeki temas sürelerinde hücre değişikliği bulunmadığı için çalışmaya dahil edilmemiştir. Klorhekzidin ile 8 saat muamele edilen *C. albicans* hücreleri için MİK ve 2xMİK konsantrasyonlarında atomik kuvvet mikroskobu görüntüleri incelendiğinde ve negatif kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır. Hücre kalınlığı (z değeri), pürüzlülük gibi değerler ölçülmüş ve kontrol hücreleri ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Normal maya görünümündeki hücrelerde bölünme ardından kalan skar dokusu görülmektedir (Resim 4.7).



Resim 4.7. 2xMİK konsantrasyonunda CHX' e maruz bırakılan hücrelerin 8. saatte 2D ve 3D görüntüleri

4xMİK konsantrasyonunda CHX'e 8 saat maruz bırakılan maya hücrelerinde hücre kalınlığında belirgin bir değişikliğe rastlanmazken, pürüzlülük değeri negatif kontrol hücrelerine göre değişim göstermektedir. Cihazın kantitatif verilerinde değişiklik olmakla birlikte, görüntüde belirgin bir değişiklik bulunmamıştır. Ancak, faz ekranı görüntülerinde yüzeydeki değişiklikler belirlenebilmektedir (Resim 4.8).

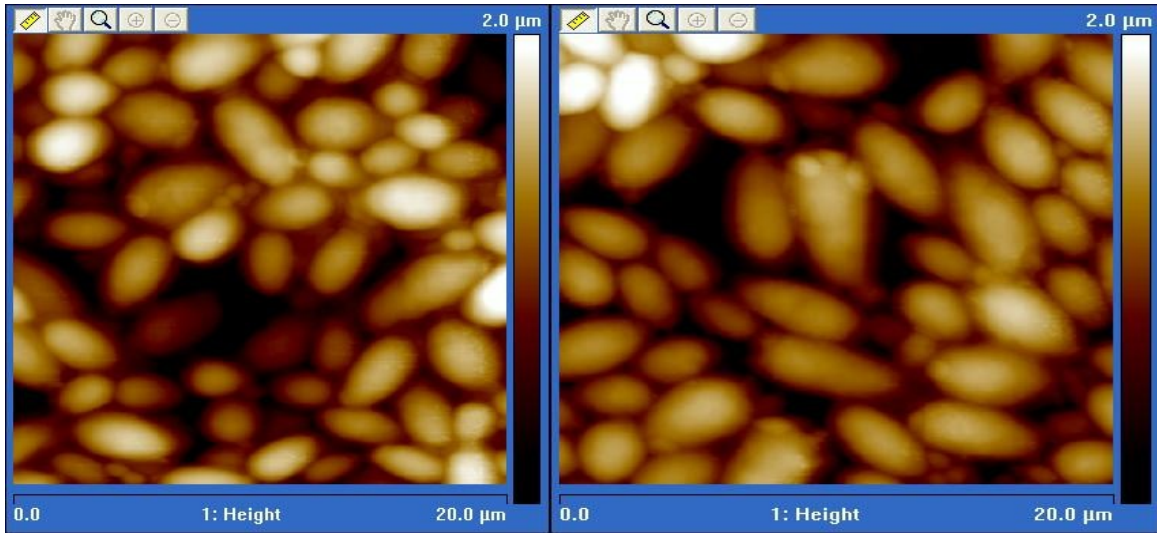


Resim 4.8. 4xMİK konsantrasyonunda CHX'e 8 saat maruz bırakılan maya hücrelerinin 3D ve faz görüntüleri

Klorheksidinin MİK konsantrasyonunda 8. ve 12. saat *Candida albicans* AFM görüntülerinde, hücre yüzeyinde çok belirgin değişikliklere rastlanmamıştır. Bu hücreler kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında da görüntü ve boyut açısından son derece

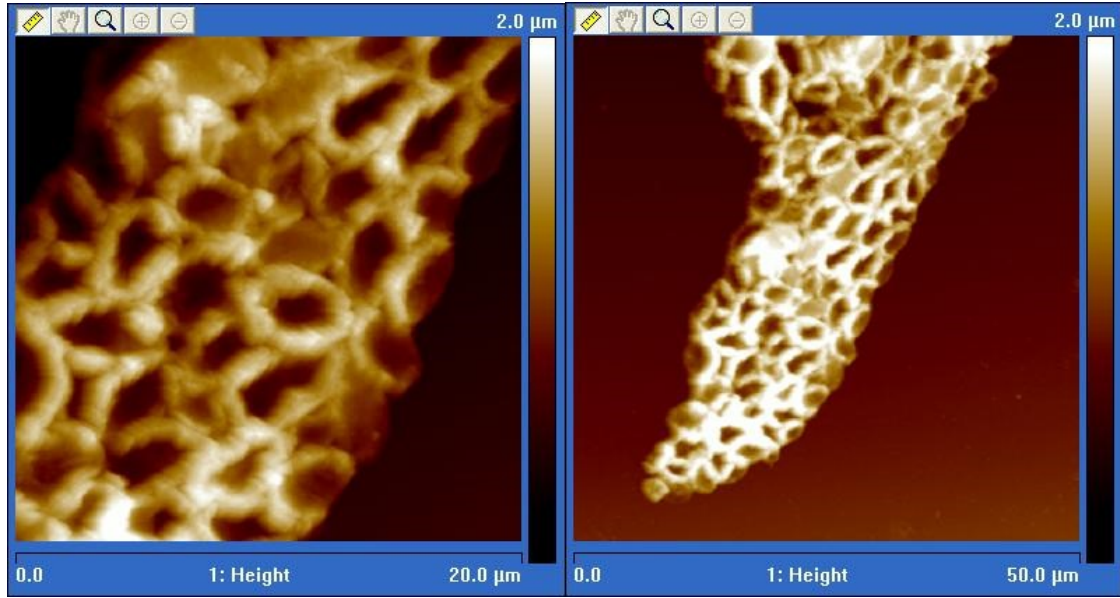
benzerdir. 12 saat MİK konsantrasyonunda CHX ile karşılaşan hücrelerin ve 12. saatte negatif kontrol hücrelerinin boyutu, 24. saat dilimindeki hücrelere göre daha büyüktür. Bu durum, bölünme öncesi hücrelerin görüntülenmiş olduğu şeklinde yorumlanabilir. Resim 4.9'da görüldüğü üzere MİK konsantrasyonunda 12. saatte mayanın tomurcuklanma bölgelerinde daha küçük hücrelerin bulunması da göz önüne alınarak, üremenin devam ettiği ve biyosid etkisinin zayıf olduğu yorumu yapılabilir.

MİK konsantrasyonunda 12 saat klorhekzidine maruz bırakılan *Candida* hücrelerinin, resim 4.9'da görüntü yüzeyi düz olmasına rağmen yüzey analizi değerlendirildiğinde konsantrasyon artışına bağlı olarak pürüzlülükteki artış anlamlıdır. Tüm konsantrasyon değerlerinde 12. saat için normal hücre yapısına benzer görüntüler elde edilmiştir ancak hücrelerin bir kısmında pürüzlülük miktarında artış gözlenmiştir.

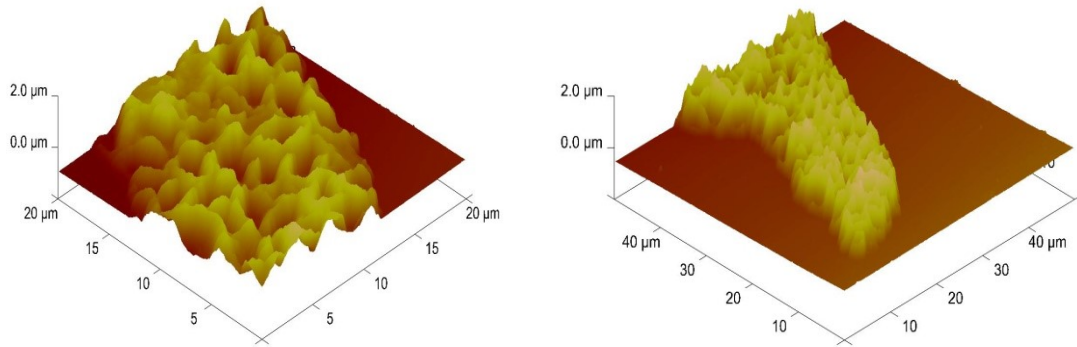


Resim 4.9. Kontrol hücrelerinin (solda) ve MİK konsantrasyonunda CHX'e maruz bırakılan maya hücrelerinin (sağda) 12. saatte iki boyutlu AFM görüntüleri

Klorhekzidinin MİK konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılan maya hücrelerinde belirgin değişiklikler meydana gelmiştir. Hücre yüzeyindeki deformasyon resim 4.10'da net bir şekilde görülmektedir. Geniş tarama alanlarındaki maya popülasyonu file benzeri bir görünüm sergilemektedir. Yüzey üzerinde meydana gelen çökme ve derin oluklar yüksek çözünürlükte de net bir şekilde görüntülenmiştir.



Resim 4.10. MİK konsantrasyonunda 24 saat CHX'e maruz bırakılan maya hücrelerinin geniş alan AFM görüntüleri

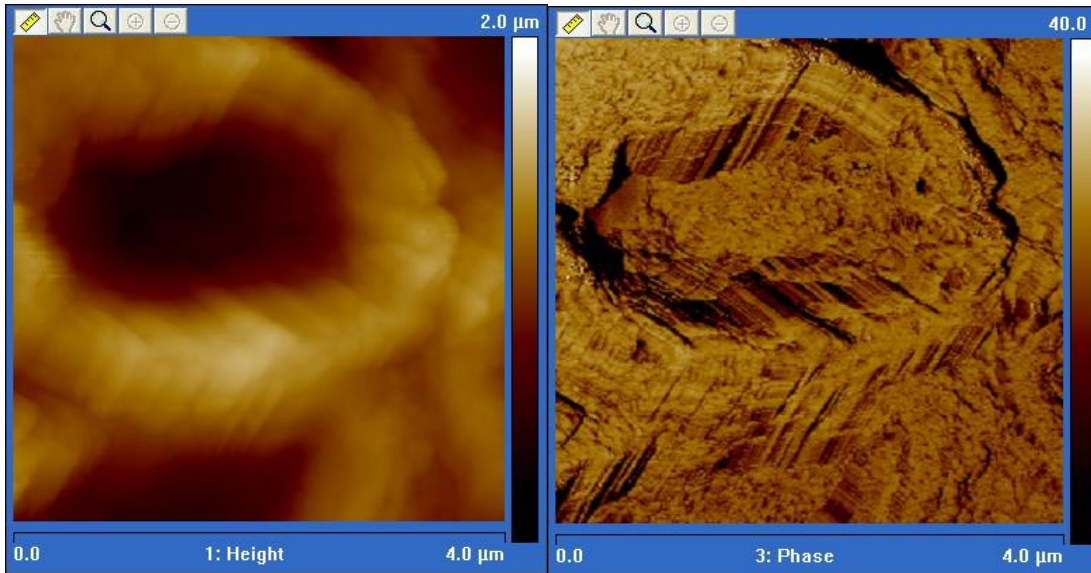


Resim 4.11. CHX'e MİK konsantrasyonunda 24 saat maruz bırakılan maya hücrelerinin üç boyutlu görüntüsü

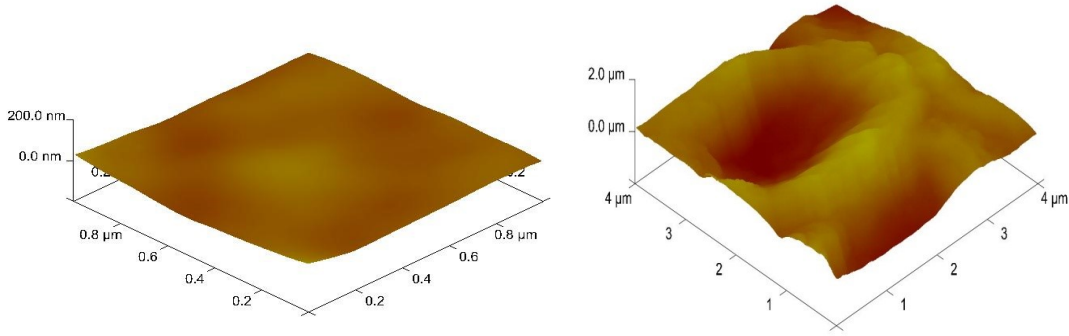


Resim 4.12. Kontrol hücreleri (solda) ve 24 saat CHX ile muamele edilen hücrelerin (sağda) $20 \times 20 \mu^2$ alandaki karşılaştırmalı faz görüntüsü

Resim 4.13 ve 4.14'de klorhekzidinin MİK konsantrasyonunda 24. saatte yüksek çözünürlüklü tek hücre AFM görüntülerine bakıldığında çökme nedeniyle büyük bir porun meydana geldiği ve normal maya formunun deforme olduğu görülmektedir.

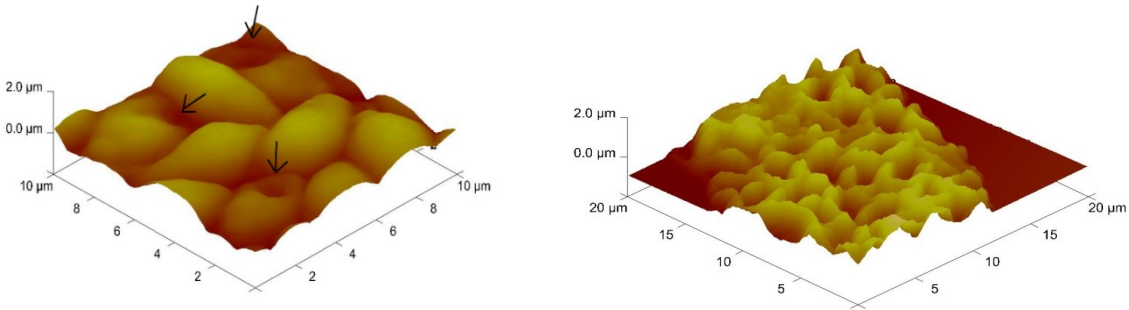


Resim 4.13. CHX ile muamele edilen maya hücrelerindeki por yapısının yüksek çözünürlüklü ($4 \times 4 \mu^2$) görüntüleri



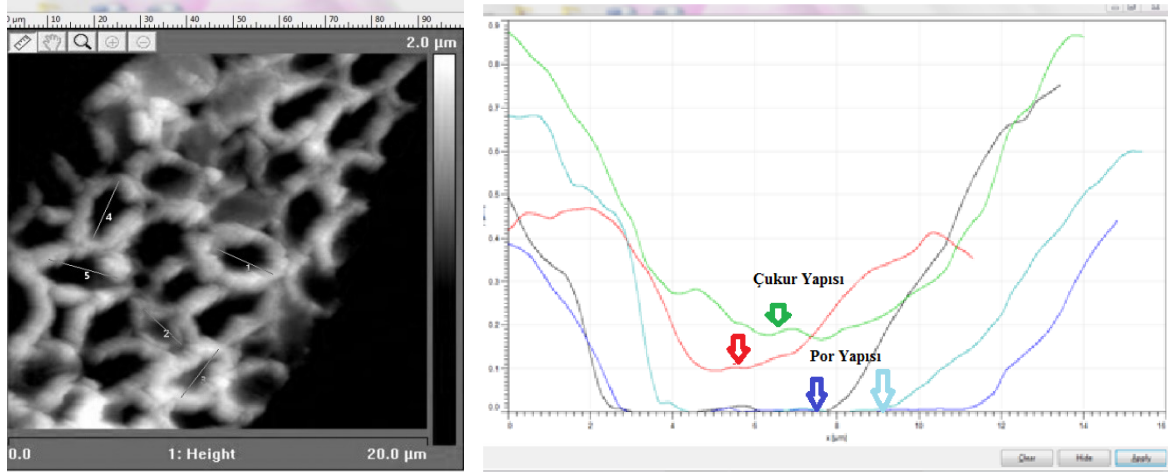
Resim 4.14. Kontrol maya hücresi (solda) ve CHX ile muamele edilen maya hücresinin (sağda) yüksek çözünürlükte karşılaştırmalı üç boyutlu görüntüsü

MİK konsantrasyonunda CHX etkisi, amfoterisin B nin 2xMİK konsantrasyonundaki artan etkisi olarak yorumlanabilir. Temas süresi artıka por genişliğinin arttığı amfoterisin B ile karşılaşmış hücrelerde de gözlenmiştir. Por oluşumu benzerlik gösterse de CHX ile karşılaşmış hücrelerde oluşan porlar çok daha geniştir (Resim 4.15).

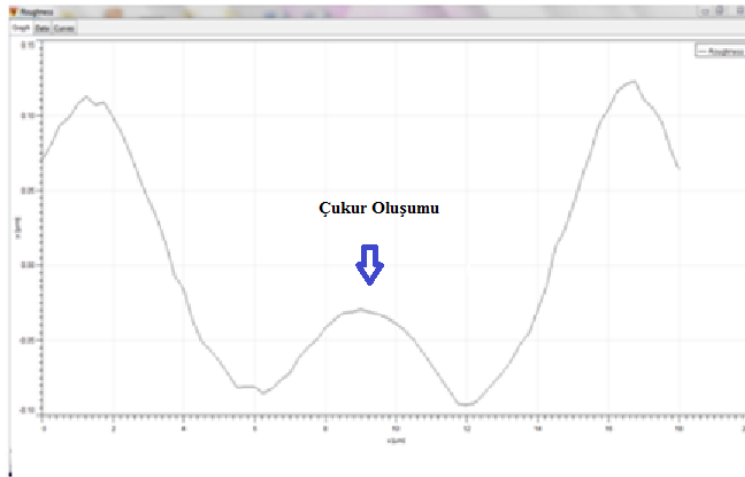


Resim 4.15. Amf B ile karşılaşmış maya hücreleri (solda) ve CHX ile karşılaşmış maya hücrelerinin (sağda) por yapılarının karşılaştırılması

Analiz sonrasında oluşan etki bazen çökme, bazen por oluşumu şeklinde yorumlanmıştır. Şekil 4.16'da gösterilen profil analizinde por oluşturan ve çökmeye neden olan hücrelerin grafikleri gösterilmiştir. Ayrıca, klorhekzidinin 24. saatteki etkisi, pürüzlülükteki artışı ve z eksenı değerlerindeki azalmayı kanıtlayan kantitatif veriler ile de desteklenmiştir. Z eksenı değerinin azalması hücre kalınlığının azaldığını göstermektedir. Bu durumun sebebi por oluşumuna bağlı olarak hücre yüzeyinin genişlemesi ve normal hücre yapısının bozulmasıdır.

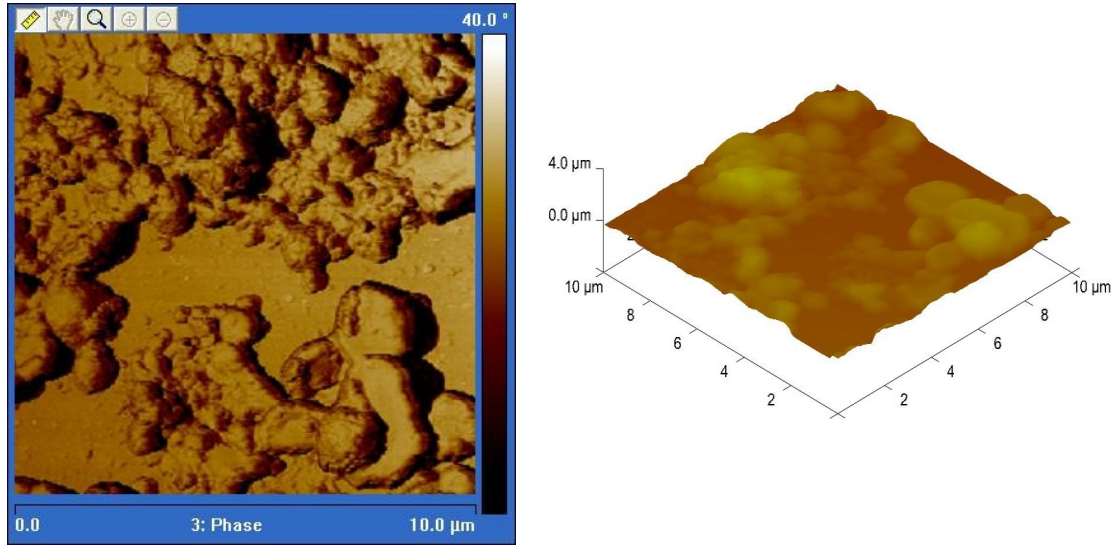


Resim 4.16. MİK konsantrasyonunda CHX ile karşılaşmış maya hücrelerinin 24. saatte profil analizi



Resim 4.17. MİK konsantrasyonunda CHX ile karşılaşmış tek bir *Candida* hücresinin 24. saatte pürüzlülük grafiği ve çukur oluşumunun gösterilmesi

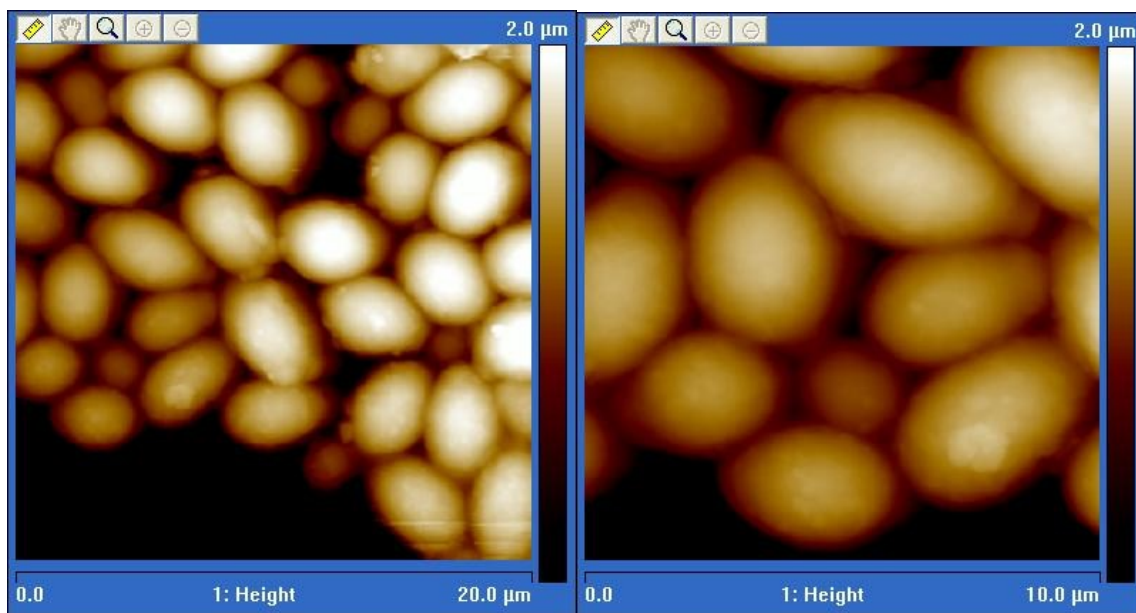
Klorhekzidinin 12. ve 24. saatteki etkisi, 2xMİK ve 4xMİK konsantrasyonlarında tamamen hücre lizisine neden olmuştur. Bu etki nistatin etkisine benzemektedir. 2xMİK ve 4xMİK CHX konsantrasyonlarında hücreler parçalanarak dağılmış ve maya formuna benzer hücre görüntüsü yok olmuştur. CHX ile karşılaşan mayalar yığıntı halini almıştır. Klorhekzidin MİK konsantrasyonunun 24. saatinden itibaren hücre lizisi başlamıştır.



Resim 4.18. 4xMİK konsantrasyonunda klorhekzidin etkisinin 12. saatte 3D ve faz ekranı görüntüleri

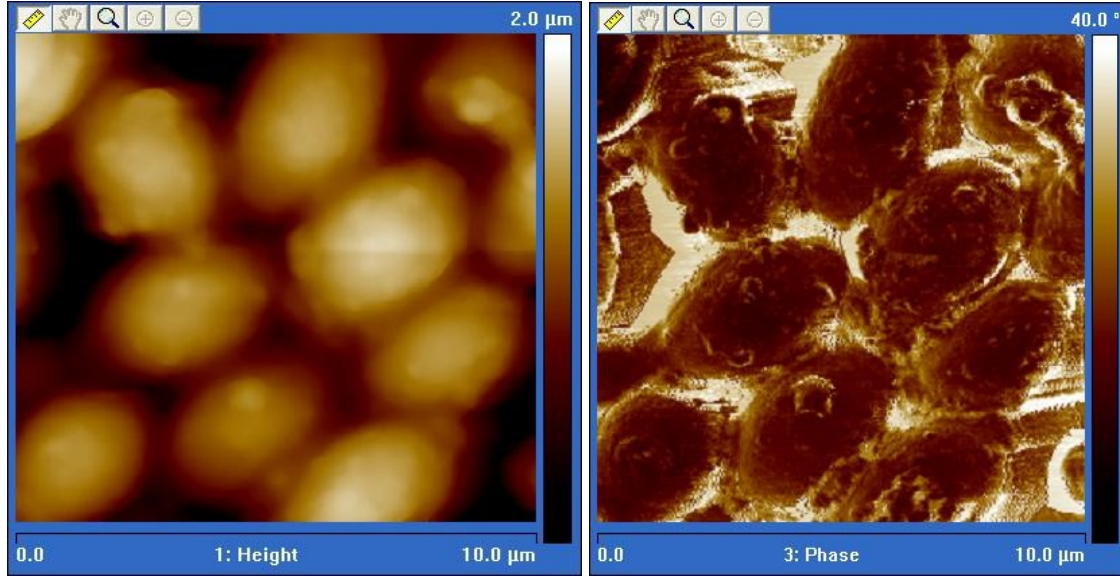
4.2.4. Benzalkonyum klorit (BNZ) için AFM sonuçları

Benzalkonyum kloritin 8 saat öncesindeki temas sürelerinde hücre değişikliği bulunmadığı için çalışmaya dahil edilmemiştir. MİK konsantrasyonunda benzalkonyum klorit için, 8. ve 12. saatte sadece görüntülerde değişiklik olmadığı yorumu yapılabilir. Bunun sebebi kontrol hücreleri ile karşılaştırılma yapıldığında muamele edilen hücrelerin normal maya formuna benzer şekilde görüntülenmesidir (Resim 4.19).

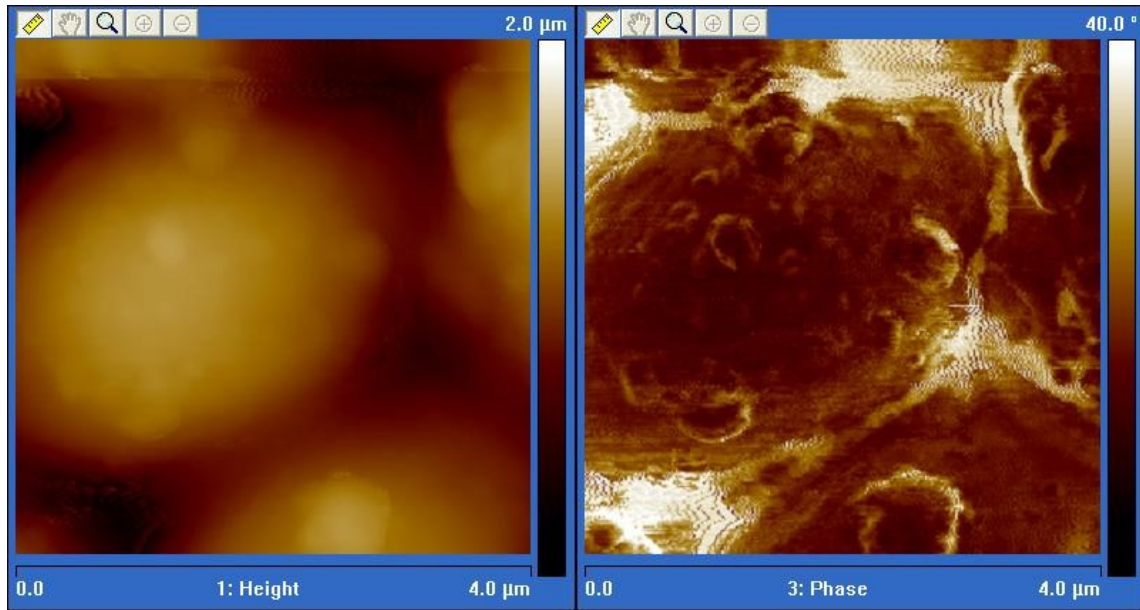


Resim 4.19. MİK konsantrasyonunda benzalkonyum klorit etkisinin 12. saatte iki boyutlu AFM görüntüsü

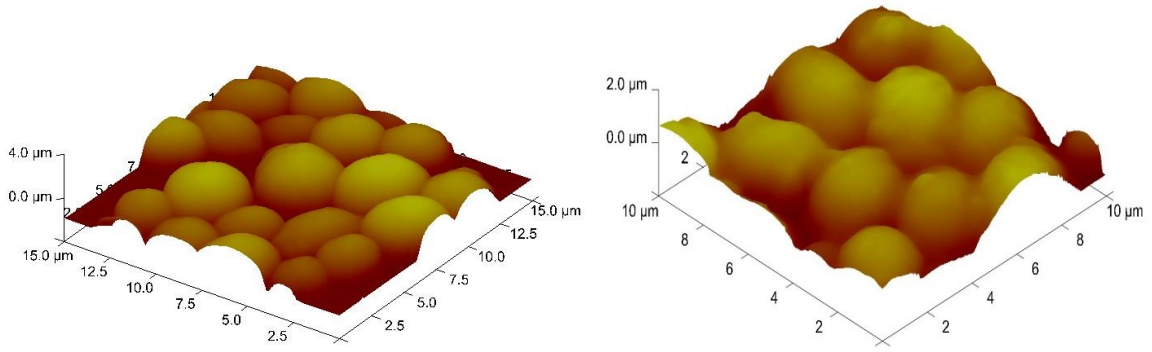
Benzalkonyum kloritin MİK konsantrasyonun 24. saatteki etkisi yüzey üzerinde belirgin bir değişime neden olmuştur. Benzalkonyumun morfolojik etkisi, hücre yüzeyinde kabarcık benzeri yapıların oluşması şeklinde gözlemlenmiştir. Görüntüde yoğun pürüzlü yüzey net şekilde görülebilmektedir. Ayrıca, kabarcık benzeri yapıların üzerinden seçilen alanlarda yapılan pürüzlülük ölçümlerinin sonucu da bu görüntüyü destekler şekildedir.



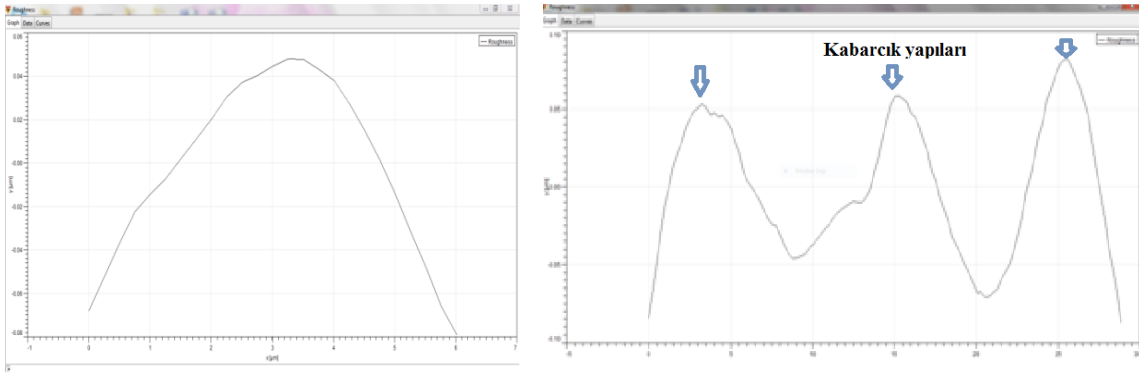
Resim 4.20. MİK konsantrasyonunda benzalkonyum kloritin 24 . saatteki etkisinin 2D ve faz ekranı görüntüsü



Resim 4.21. MİK konsantrasyonunda benzalkonyum kloritin 24. saatte etkisinin yüksek çözünürlüklü AFM görüntüsü

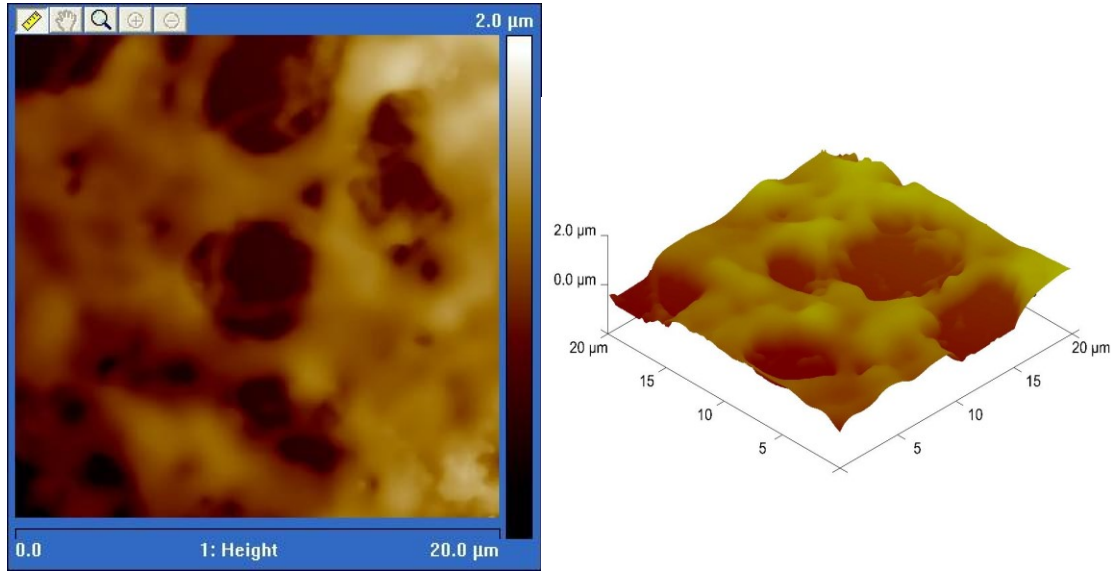


Resim 4.22. Negatif kontrol hücreleri (solda) ve 24 saat BNZ ile muamele edilen hücrelerin (sağda) karşılaştırmalı 3D görüntüsü



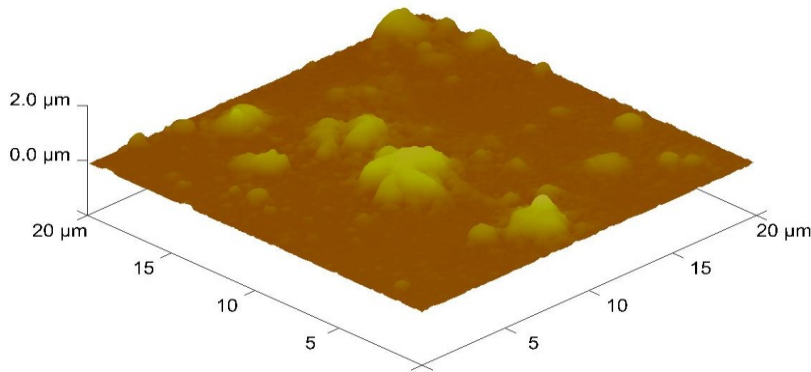
Resim 4.23. Negatif kontrol hücreleri (solda) ve 24 saat BNZ ile muamele edilen hücrelerin (sağda) karşılaştırmalı pürüzlülük grafiği

Benzalkonyum klorit 2x MİK konsantrasyonunda 8. saatte hücre yapısını bozmuştur ve yüzeyde büyük oluklar gözlenmektedir. Bu derin oluklar, hücre içeriğinin boşalması olarak yorumlanabilir. Bu etki resim 4.24' de gösterilmektedir.



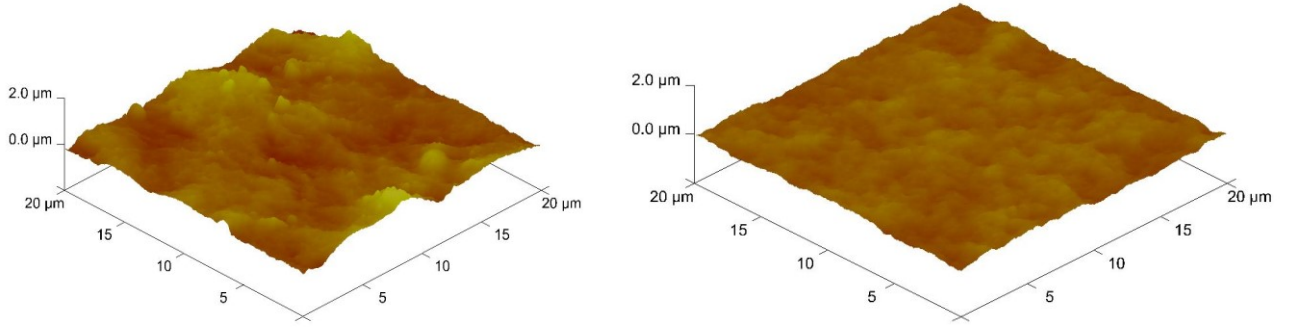
Resim 4.24. Benzalkonyum klorit 2x MİK konsantrasyonunun 8. saatteki etkisi

Benzalkonyum klorit etkisi 2x MİK konsantrasyonunun 12. ve 24. saatte etkisi artmıştır. Maya hücreleri parçalanmış ve yüzeye dağılmıştır. Hücreler üç boyutlu maya formunu tamamen kaybetmiştir. Bu etki resim 4.25' de gösterilmektedir.



Resim 4.25. Benzalkonyum klorit 2xMİK konsantrasyonunda 24. saatteki etkisi

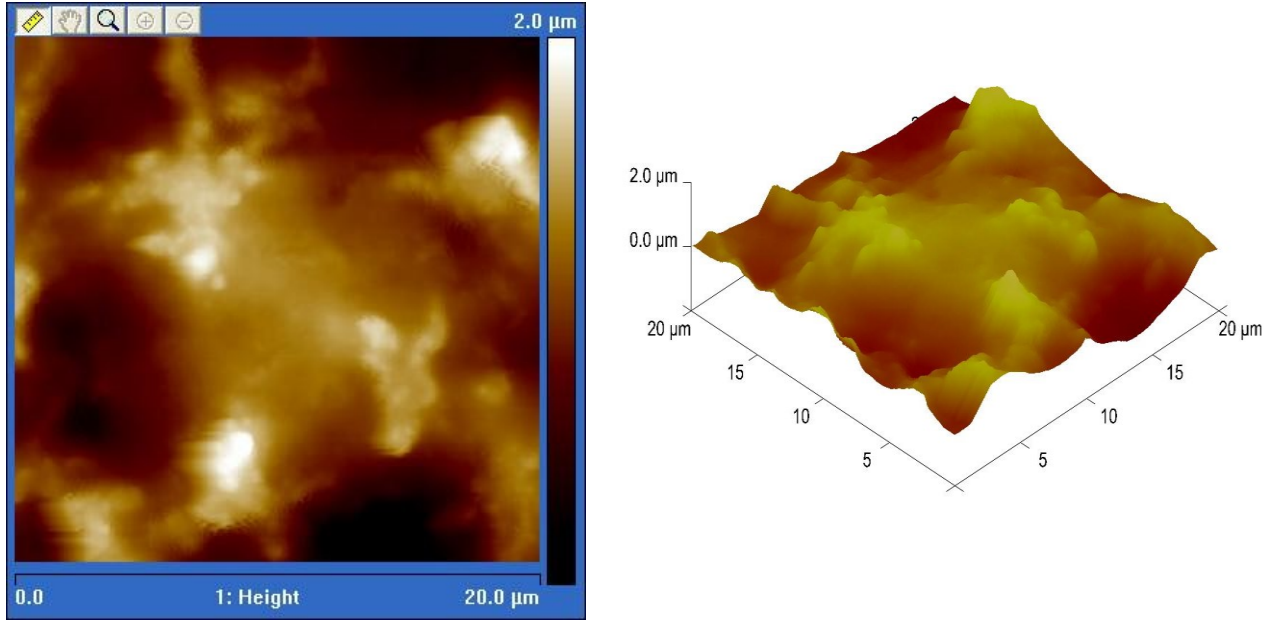
4xMİK konsantrasyonunda benzalkonyum ile 8, 12 ve 24 saat muamele edilen tüm hücreler için, hücre lizisi tamamen gerçekleşmiştir. 4xMİK konsantrasyonunda BNZ ile karşılaşan hücrelerde, nistatin veya yüksek konsantrasyonda amfoterisin B ile muamele edilen hücrelerdeki ile benzer etki görülmektedir. Yapılan analizler sonucu z değerinin azalma sebebi, maya hücrelerinin parçalanarak cam yüzey üzerine yayılmasıdır.



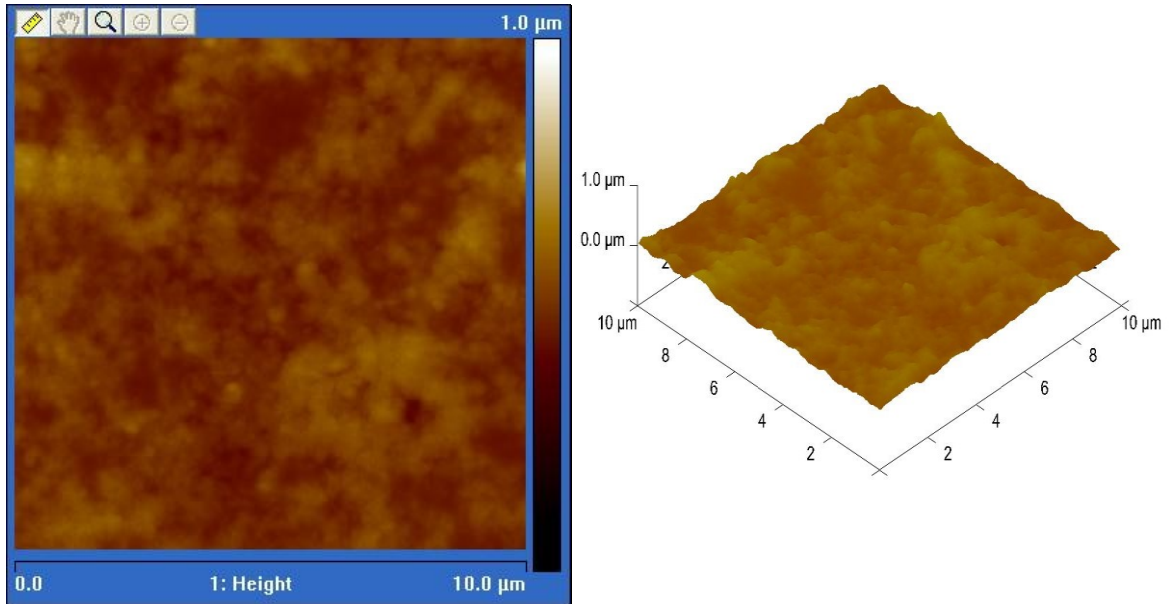
Resim 4.26. Nistatin (solda) ve 4xMİK konsantrasyonunda BNZ ile karşılaşmış hücrelerin (sağda) 12. saatte karşılaştırmalı görüntüsü

4.2.5. Sodyum hipoklorit (SHC) için AFM sonuçları

Sodyum hipoklorit, MİK, 2x MİK ve 4x MİK konsantrasyonlarının hepsi için ve tüm saat dilimlerinde hücre lizisine neden olmaktadır. SHC ile karşılaşmış hücrelerin, hücre içeriği boşalmış ve hücre yapısı tamamen bozulmuştur. Bu etki 5 dk SHC ile muamele edilen hücrelerde başlamaktadır. Sodyum hipoklorite 24 saat maruz bırakılan hücrelerin üç boyutlu AFM görüntüleri, cam yüzey ile birleşmiş gibi düz görülmektedir. Sodyum hipokloritin antifungal etkisi, nistatin etkisine benzemektedir. SHC, hücre yüzeyini düşük konsantrasyonda çok kısa sürede etkilemektedir. Yapılan kantitatif analiz sonucunda pürüzlülükte artış gözlenirken, z eksen değeri farklılık göstermektedir. MİK konsantrasyonunda SHC ile karşılaşan hücrelerin 24. saatte z değeri azalırken, 12. saatte yüzeyde bazı alanlarda artış görülmüştür. Bu durumun sebebi parçalanmış hücrelerin lizis sonrası birikerek yığıntı oluşturmasıdır.



Resim 4.27. Sodyum hipokloritin MİK konsantrasyonunda 12. saatteki etkisinin 2D ve 3D AFM görüntüleri



Resim 4.28. Sodyum hipokloritin MİK konsantrasyonunda 24. saatteki etkisinin 2D ve 3D AFM görüntüleri

5. TARTIŞMA

Bağıışıklığı baskılanmış hastalarda nozokomiyal infeksiyona yakalanma oranı oldukça fazladır. Fırsatçı patojen *Candida albicans* immünsupresif hastalarda en sık rastlanan fungal etmendir [52]. Bu nedenle bu çalışmada *Candida albicans* ATCC 10231 suşu seçilmiştir. *Candida albicans* gibi fungal hücrelerin yüzey özellikleri patojenitede önemli bir rol oynar [51].

Fungal infeksiyonlara karşı antifungal aktivite gösteren ilaçlar, doğal ürünler ve biyosidler kullanılmaktadır. Biyosid terimi antiseptik, dezenfektan ya da bazı durumlarda koruyucu aktiviteye sahip bileşikler tarif etmek için kullanılmıştır [12]. Bu çalışma için sodyum hipoklorit (SHC), benzalkonyum klorit (BNZ) ve klorhekzidin (CHX) biyosidler seçilmiştir. Bu biyosidlerin seçilmesinin temel nedeni dezenfektan ve antiseptik olarak yaygın kullanımlarıdır. Biyosidlerin bakteri üzerindeki etkilerine dair birçok çalışma mevcuttur, fakat mantarlar üzerindeki etkisine dair çalışmalar kısıtlıdır [8]. Klorhekzidin, benzalkonyum klorit ve sodyum hipoklorit gibi biyosidlerin hücre yüzeyine etki ettikleri bilinmektedir. Hücre yüzeyi üzerine etkinin mantarlar içinde geçerli olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda amfoterisin B ve nistatin antifungalleri etki mekanizmaları nedeniyle pozitif kontrol olarak seçilmiştir. Bu antifungaller, mantar yüzeyinde porların açılması, membran bütünlüğünde bozulma ve membran geçirgenliğinde artma, hücre içeriğinin hücre dışına çıkışı şeklinde etki etmektedir ve antifungal etki mantar hücresinin ölümü ile sonuçlanmaktadır. Biyosidlerin de maya hücresinin yüzeyinde bunlara benzer bir etki göstermeleri beklenmektedir.

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), 1986'dan beri hücre yüzeyinin nanometre boyutunda yüksek çözünürlükte incelenmesine olanak sağlar. Çalışma prensibi, örneklerin mercekler, fotonlar veya elektronlar olmadan mekanik olarak taranması temeline dayanır [54]. AFM, biyomoleküller ve hücreler gibi biyolojik örneklerin biyomekanik özelliklerinin ve nano ölçekte yapısal detaylarının incelenmesi için önemli bir cihazdır. AFM, mikrobiyoloji çalışmalarında mikroorganizmaların yüzeyini yüksek çözünürlükte kalitatif ve kantitatif analiz imkanı sunduğu ve büyüme, ilaç ile etkileşim sebebiyle meydana gelen yüzey değişimlerinin incelenmesini sağladığı için büyük önem taşır.

Antimikrobiyal ajanların hücre yüzeyi üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmalarda atomik kuvvet mikroskopunun kullanımı gitgide artmaktadır. AFM, morfolojide ki ve hücre geçirgenliğinde ki değişimin saptanmasında kullanılmaktadır [55]. AFM kullanılarak antifungallerin ve doğal ürünlerin mantarlar üzerine etkisinin incelendiği birçok çalışma mevcuttur. Ancak biyosidlerin hücre yüzeyine antifungal etkisinin AFM ile detaylı bir şekilde incelendiği çalışmalara rastlanmamıştır.

Hastane ortamında kullanılan dezenfektanların seçimi direnç oluşması açısından çok önemlidir. Doğru dezenfektan, uygun konsantrasyonlarda ve yeterli süre kullanılmazsa dezenfektanlara karşı direnç gelişebilir [33]. Bu çalışmada uygun konsantrasyon ve temas süresinin belirlenmesi ile kullanılan biyosidlerin *Candida albicans* hücrelerinde morfolojik etkilerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda AFM kullanılarak CHX, BNZ ve SHC'in *Candida albicans* referans kökeni ATCC 10231 üzerindeki etkisi görsel olarak incelenmiştir. Klorhekzidinin konsantrasyondan çok temas süresine bağlı olarak *Candida* yüzeyinde por oluşturduğu belirlenmiştir. Benzalkonyumun ise temas süresinden çok konsantrasyon bağımlı olarak, yüzeyde geniş oluklar oluşturduğu tespit edilmiştir. BNZ'un düşük konsantrasyonlarda ise yüzeyde kabarcıklar oluşturduğu görülmüştür. Sodyum hipokloritin ise doğrudan hücre lizisi yaptığı görülmüştür.

Sautour ve arkadaşlarının 1999' da yapmış olduğu çalışma ile bisbiguanidlerin (5µg/mL konsantrasyonda) kısmen ya da tamamen filamentasyonu inhibe ettiği ve böylece klorhekzidinin *C. albicans* patojenitesini etkilediği görülmüştür. Bunun sebebi olarak ise hücre membranı düzeyinde enzim inhibisyonu düşünülmektedir [32].

Atomik kuvvet mikroskopunun kullanımı sağlık bilimlerinde sadece mikrobiyoloji ile sınırlı değildir. Diş hekimliğinde de AFM ile yapılan birçok çalışma mevcuttur. Valois ve arkadaşları ile İşçi ve arkadaşları, endodontik tedavide mikroorganizmalarla bulaşın engellenmesi için kök kanal kaplama materyallerini % 2 klorhekzidin ve % 5,25 sodyum hipoklorit ile dezenfekte etmiş ve bu dezenfektanların bu materyaller üzerine aşınma etkisini AFM ile yüzey pürüzlülüğünü ölçerek incelemişlerdir [62,63]. Bizim çalışmamızda da CHX ve SHC biyosidleri yer almaktadır, ancak bu çalışmalarda

biyosidlerin hücre üzerine etkisi değil kaplama materyalleri üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

Dezenfektanların mikroorganizmaların karşı etkisi, mikroorganizmanın yapısal özelliklerine göre değişmektedir. Fungal hücre duvarının biyosid penetrasyonunu azaltmadaki rolü birçok çalışma ile gösterilmiştir. Hiom ve arkadaşları *Saccharomyces cerevisiae*'nin hücre duvar yapısının klorhekzidin alımını nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Yapılan deneyler ile mantarların duvarındaki gluklan yapısının klorhekzidinin hücre içine girişini sınırlandırdığı, bu etkide mannanın hücre direncinde rol oynamadığı belirtilmiştir. *Candida albicans*' in hücre duvar yapısı gereği klorhekzidine daha az duyarlı olduğu da bu çalışma ile gösterilmiştir [11].

Bobichon ve Bouchet, tomurcuklanan *Candida albicans* kökenini öldürücü konsantrasyonunun altındaki konsantrasyonlarda klorhekzidine maruz bırakmışlar ve taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve geçirmeli elektron mikroskopu (TEM) ile incelemişlerdir. Hücre yüzeyinin SEM ile analizi sonucunda, klorhekzinin maya hücresinin duvarında modifikasyonlara neden olduğu ve plazma membranına zarar verdiği sonucuna varmışlardır [8]. Bizim çalışmamızda, yüzey analizi için SEM ile karşılaştırıldığında birçok avantaja sahip olduğundan dolayı AFM kullanılmıştır.

Soon ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma, AFM ile görüntüleme için örnek hazırlama aşamasında santrifüj ve yıkama aşamalarını karşılaştırmış ve görüntü kalitesi için 3000 x g'de 5 dakika santrifüj yapılmasını ve iki kez su ile yıkamayı önermişlerdir. Örnek hazırlama protokolündeki bu aşamaların besiyeri ve hücre kalıntılarının temizlenmesi açısından önemi gösterilmiştir. Ayrıca, yüksek konsantrasyonda kolistine maruz bırakılan hücrelerde yüzey düz görüntülenmesine rağmen, pürüzlülük ölçümleri anlamlı sonuçlar vermiştir [54]. Bizim çalışmamızda, 9000xg'de santrifüj ve iki kez yıkama aşamalarına ek olarak metilen mavisi ile boyama işlemi uygulanmıştır. Boyama yapılan preparatların, geniş numune yüzeyinde görüntülenecek hücre topluluklarının seçimi ve AFM görüntülerinin netliği açısından daha iyi olduğu belirlenmiştir. Biyosidlere maruz bırakıldığı halde yüzeyi düz görünen, fakat pürüzlülükte negatif kontrol hücrelerine göre artış gösteren hücrelerin olması açısından da çalışmamız bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Atomik kuvvet mikroskobu mikroorganizmaların doğal ortamlarına yakın koşullarda havada veya sıvı içerisinde incelenmesine olanak verir. Kriznik ve arkadaşları sodyum nitrat solüsyonu içerisinde sıvı ortamda *Candida albicans* hücrelerinin maya ve hifsel formlarının hücre yüzeyini AFM ile incelemişlerdir [51]. Bizim çalışmamızda ise *Candida* hücrelerinin maya formu hava ortamında cam yüzey üzerinde incelenmiştir. Yüzeyin incelenmesine olanak sağlayan diğer tekniklere göre AFM 'nin örnek hazırlık aşamaları daha kolaydır. Fakat, $1 \times 1 \text{ cm}^2$ katı yüzey üzerinde yapılan incelemelerde örnek hazırlama aşamasındaki kritik nokta örneğin yüzeye iyi bir şekilde bağlanmasını sağlamaktır [57]. Bizim çalışmamızda alevden geçilerek ve havada kurtularak fiksasyon yapılmıştır.

Formosa ve arkadaşları, *S. cerevisiae* ve *C. albicans* maya kökenlerini gözenekli membranlar içerisinde fikse ederek kaspofunginin etkilerini tek hücre düzeyinde nanoboyutta AFM ile incelemişlerdir [58]. SEM gibi hücre yüzey analiz teknikleri geniş alanlarda tarama yapabilirken atomik kuvvet mikroskobu aynı zamanda tek hücre görüntülemesine olanak sağlayan bir tekniktir. Bu sebeple, bu çalışmada hücre yüzeyinin incelenmesi için AFM tercih edilmiştir.

Aytaç ve arkadaşları *Salmonella enteritidis*'in AFM ile görüntülenmesini çalışmışlardır. Bu çalışmada bakteri boyunu $2,635 \text{ }\mu\text{m}$ enini $0,993 \text{ }\mu\text{m}$ olarak ölçmüşlerdir ve bu verilerin orjinal bakteri boyutuyla (boy $2-5 \text{ }\mu\text{m}$, en $0,7-1,5 \text{ }\mu\text{m}$) uyumlu olduğu sonucunu çıkarmışlardır. Bu verilerin de sonucunda atomik kuvvet mikroskobunun mikroorganizmaları tanımlamada kullanılabileceği sonucuna varmışlardır [56]. Bizim çalışmamızda biyosid ile muamele edilmemiş kontrol hücrelerinin boyutları mayaların orjinal boyutundan farklılık göstermektedir. Hücre boyuttaki bir miktar küçülmenin inceleme amacıyla cam üzerine yapılan fiksasyon sırasında kuruma nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir. Bizim çalışmamızdaki sonuçları destekleyen veriler başka çalışmalarda da görülmüştür. Bu çalışmalarda da mantar ve bakteri boyutunun orjinal boyutundan azalmalar gösterdiği görülmüştür [59,60].

Bizim çalışmamız, biyosid çeşidi, temas süresi ve konsantrasyon miktarının *Candida albicans* hücresi üzerine etkisini inceleyen çok değişkenli bir çalışmadır. Gammoudi ve arkadaşları, herhangi bir etkene maruz kalmamış normal *Escherichia coli* hücrelerinin zamana bağlı değişimini AFM ile incelemişlerdir. *E. coli* hücrelerinin bir hafta, iki hafta ve bir ay sonundaki görüntülerinde membran geçirgenliğinde artma, yüzeyde dalgalanma

benzeri bir görüntü ve hücrelerde çökmeye neden olmuştur. Bu çalışmada uzun süreler sonunda görüntülenen normal hücreler, bizim çalışmamızda biyosid ve antifungal ile muamele edilen hücreler ile benzer etkiler oluşturmuştur [65].

Tondernik ve arkadaşları, *Aspergillus* spp. ve *Candida* spp. hücrelerinin büyümesi üzerine oligoG ile beraber antifungallerin etkisini atomik kuvvet mikroskobu ile incelemişlerdir. Sadece flukonazole maruz bırakılan yuvarlak *Candida* hücrelerinin basık gözlenirken, oligoG ile flukonazolün beraber etkisi ile hücreler basık ve buruşuk gözlenmiştir.

AFM ile biyolojik örneklerin sadece nanometrik boyutta kalitatif verileri görüntülenmez, aynı zamanda biyomateryal özelliklerinin kantitatif verileri de ölçülebilir [55]. Kim ve arkadaşları, Alicin ile antifungal ilaçların kombinasyonunun *Candida albicans* hücreleri üzerine kalitatif ve kantitatif analizini yapmışlardır. Alicin ve antifungale maruz bırakılan hücrelerdeki kantitatif değişiklikleri AFM ile görüntülemişler ve hücrelerdeki membranın çökmesi gibi morfolojik değişimi membran geçirgenliğinin artışına bağlamışlardır. Hücre membranı ve AFM tip arasındaki etkileşim (adhesive force), membran özelliklerine karşı çok duyarlıdır. AFM ile bu etkileşimi ve hücre membranının sertliğini kalitatif olarak ölçmüşler ve kontrol hücreleri ile değişimi karşılaştırmışlardır [53]. Kim ve arkadaşları bu çalışmada AFM inceleme yöntemi olarak temaslı yöntem kullanmışlardır, bu yöntem sertliğin kalitatif olarak ölçümüne olanak sağlamaktadır. Bizim çalışmamızda vurmali yöntem ile AFM incelemesi yapılmıştır, bu sebeple membran sertliği verileri elde edilememiştir.

Campos ve arkadaşları, sekiz mikroorganizma üzerine kaju ağacı sakızının antimikrobiyal etkisini AFM ile incelemişlerdir. AFM görüntüleri ve analiz ölçümleri ile değerlendirildiğinde kaju sakızı ağacı gram pozitif bakteriler üzerine etkili bulunurken, *Candida albicans* ve *Lactobacillus acidophilus* üzerine etkisiz bulunmuştur [64]. Bu çalışmada antimikrobiyal etki bizim çalışmamızda olduğu gibi hücrelerde çökme, pürüzlü yüzey görüntüsü ve mikroorganizmaların yıkıntı haline gelmesi ile kanıtlanmıştır. Bu hücrelerdeki analiz ölçümlerinde rms (pürüzlülük) değerindeki artış ve yükseklik yani hücre kalınlığındaki azalma da bizim çalışmamızın verileriyle benzerlik göstermektedir.

Tyagi ve Malik , *E. coli* ve *C. albicans* üzerinde LGO (lemon grass oil) etkisini atomik kuvvet mikroskobu ile incelemişlerdir . Hem bakteri hem de mantar için pürüzlülük, yüzey

alan farklılığı, uzunluk ve z eksen değeriğini belirlemiş ve bu değeriiler ile kontrol hücrelerini karşılaştırmıştır. Elde ettiği veriler bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Kontrol hücreleri ile muamele edilmiş hücreler arasında hem görüntüde hem de analiz değeriilerinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. LGO ile muamele edilmiş hücrelerin uzunluk, z eksen, pürüzlölük değeriiler ve yüzey alan farklılığı yüzdesi incelenerek LGO'in antimikrobiyal aktivitesi kanıtlanmıştır [59,60]. Bizim alışmamızda, negatif kontrol hücrelerine göre biyosid ile muamele edilen hücrelerin z eksen değeriilerindeki azalma, pürüzlölük değeriilerindeki artış ve yüzey alan farklılığı yüzdesinin değişimi ile biyosidlerin antifungal aktivitesi kanıtlanmıştır ve bu verilerdeki değişim açısından Tyagi ve Malik'in çalışmaları ile uyumludur.

Kim ve arkadaşları yapmış olduklar bir çalışmada, antifungal ajanlar ile muamele edilen *Candida albicans* hücrelerinin ölüm sürecini atomik kuvvet mikroskobu ile incelemişlerdir. Maya hücreleri, amfoterisin B ve flusitozine 6, 12 ve 18 saat maruz bırakılmıştır. 6. saatte dış membranda çökme ve soyulma gözlenmiştir. Benzer etkilere ek olarak 12. ve 18. saatte büzölme ve morfolojide ciddi deformasyonlar gözlenen değişikliklerdir. Ayrıca, hücre yüzeyinin üç boyutlu görüntölünmesi ile z eksen değeriiler temas sürelerine göre değerlendirilmiştir. Temas süresinin uzaması z eksen değeriilerinin yani hücre kalınlığının azalmasına neden olmuştur [39]. Kim ve arkadaşlarının çalışmasında elde edilen görüntüler ile bizim çalışmamızdada biyosidlerle muamele edilen hücrelerin görüntöleri benzerlik göstermektedir. Ayrıca, biyosid konsantrasyonu ve temas süresi arttıkça *Candida* hücrelerinin z eksen değeriiler azalmıştır.

Quasim ve arkadaşları, *Candida albicans* hücresi üzerine gümüş nano partiköllerinin antikandidal etkisini SEM, TEM ve AFM kullanarak araştırmışlardır. Elde ettikleri iki boyutlu ve üç boyutlu AFM görüntöleri ile hücre yüzeyinde kabarcık benzeri yapıların oluşumu ve maya formunun bozulması gibi antikandidal etkiler tespit etmişlerdir [61]. Bu çalışmada gümüş partiköllerinin maya hücreleri üzerine yapmış olduğu etki, bizim alışmamızda BNZ'un MİK konsantrasyonunda 24. saatteki etkisi ile benzerdir. Çalışmamızda BNZ aynı şekilde hücreler üzerinde kabarcık oluşumuna ve yüzey deformasyonuna neden olmuştur.

Membran bütönlüğünün bozulması membran geçirgenliğindeki değişimlere bağlıdır. Li ve arkadaşları, *E. coli*, *S. aerus* ve *C. albicans* hücrelerinin membran geçirgenliği üzerine

korilagin etkisini araştırmışlar ve bunun için bu mikroorganizmaları MİK ve 4xMİK konsantrasyonlarında korilagin ile 8 saat muamele etmişlerdir. Korilagine maruz bırakılan hücrelerin ve kontrol hücrelerinin görüntülenmesi ve morfolojik parametrelerinin ölçülmesi AFM ile yapılmıştır. Korilagin hücre yapısında kopmalar ve büyük porlar gibi belirgin değişikliklere neden olmamasına rağmen MİK değerinde hücre yüzeyinde düzensizliklere neden olmuş , 4xMİK değerinde membran bütünlüğünü bozduğu sonucuna varılmıştır. Korilaginın artan konsantrasyonlarında uzunluk, genişlik, yükseklik ve pürüzlülük gibi morfolojik özelliklerdeki anlamlı değişimin sebebinin hücre geçirgenliğinin artması olduğu sonucunu çıkarmışlardır [53]. Bizim çalışmamızda MİK ve 4xMİK konsantrasyon değerlerini ve 8 saat temas süresini içermektedir. Çalışmamızda CHX ve BNZ'a maruz bırakılan hücrelerde 8. saatte MİK değerinde normal hücre yapısı gözlenmiştir. 4xMİK değerinde CHX ile karşılaşan *Candida* hücrelerinde 8. saatte pürüzlülük artışı ve faz değişiklikleri görülürken, BNZ 4xMİK değerinde hücre lizisine neden olmuştur. SHC'in ise MİK ve 4xMİK konsantrasyonlarında 8. saatteki etkisi hücre yapısının tamamen parçalanması şeklindedir. Bizim çalışmamızda da yüzeydeki tüm hücresel değişiklikler biyosid aktivitesi nedeniyle membran geçirgenliğinin artmasına bağlanmıştır.

Biyomoleküler sürecin analizi gerçek zamanlı olarak çok uzun zaman alır. Bu nedenle, saniyede 30 kareden fazla görüntü alabilen yüksek hızlı AFM (High-Speed AFM) geliştirilmiştir. Yüksek hızlı AFM ile protein-protein, DNA-enzim, ilaç-hücre yüzey etkileşimleri ile aktin ve miyozin, mikofilamentler gibi yapıların yüzeyi incelenmiştir [49,66]. Daha fazla hücrenin daha kısa sürede incelenmesine olanak vereceği için, yüksek hızlı AFM ile farklı konsantrasyonlarda biyoside maruz bırakılan *Candida albicans* hücrelerinin morfolojik değişimlerinin gerçek zamanlı olarak görüntülenmesi biyosid etkisi hakkında kesin zamanlı sonuçlar verir.

Candida albicans hücresi üzerinde atomik kuvvet mikroskobu ile yapılan önceki çalışmalar, sadece konsantrasyon, antimikrobiyal etkisi araştırılan madde veya temas süresi gibi tek değişkenli çalışmalardır. Çalışmamızda tüm bu değişkenler birlikte kullanılmış ve etkileri karşılaştırılmıştır. Bizim çalışmamız, hem bu açıdan hem de kantitatif ve kalitatif analiz verilerini birlikte içermesi açısından daha geniştir. Çalışmamızın sonuçları değerlendirildiğinde, klorhekzidin, benzalkonyum klorit ve sodyum hipokloritin *Candida albicans* üzerindeki morfolojik etkisine ait orjinal sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, *Candida*

albicans üzerine kullandığımız biyosidlerin etkisini, atomik kuvvet mikroskobu ile görüntüleyerek ve değişiklikleri nano boyutta ölçerek gösteren başka bir çalışma olmadığı için tam karşılaştırma yapılamamıştır.

6. SONUÇ

Çalışmada *Candida albicans* ATCC 10231 referans kökeninin klorhekzidin (CHX), benzalkonyum klorit (BNZ), sodyum hipoklorit (SHC), nistatin (NST) ve amfoterisin B (AMB) için minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) değerleri “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) tarafından mayalar için standardize edilen mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Bu değerler göz önüne alınarak, *Candida* hücreleri farklı biyosidler ile farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde muamele edilmiştir. Bu hücreler atomik kuvvet mikroskobu ile görüntülenmiş ve morfolojik parametrelerinin analizi yapılmıştır. Elde edilen tüm veriler hiçbir biyoside veya antifungale maruz kalmamış negatif kontrol hücreleri ve antifungallere maruz bırakılan pozitif kontrol hücreleri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmektedir;

- ✓ Klorhekzidin etkisi konsantrasyona kısmen bağımlıdır.
- ✓ Klorhekzidin etkisi temas süresine bağımlıdır. Düşük konsantrasyonlarda bile temas süresi arttıkça hücre yüzeyi üzerindeki por oluşturuıcı etkisi artmaktadır.
- ✓ Benzalkonyum klorit etkisi temas süresine kısmen bağımlıdır.
- ✓ Benzalkonyum klorit etkisi daha çok konsantrasyon değişiminden etkilenmektedir. Konsantrasyon arttıkça morfolojik deformasyon artmaktadır. Benzalkonyum klorit konsantrasyonu arttıkça *Candida* hücresi üzerinde sırasıyla hücre yüzeyinde kabarcık benzeri yapıların oluşması, hücre yüzeyinden parça kopması, yüzeyde derin olukların oluşması, hücre içeriğinin boşalması ve hücre lizisi etkileri görülmektedir.
- ✓ Klorhekzidin ve benzalkonyum klorit, temas süresi ve konsantrasyon arttıkça hücre lizisine neden olmaktadır.
- ✓ Sodyum hipoklorit, temas süresi ve biyosid konsantrasyonundan bağımsızdır. SHC düşük konsantrasyonlarda ve çok kısa sürede hücre üzerine parçalayıcı olarak etki etmektedir.

- ✓ Sodyum hipoklorit, *Candida albicans* üzerine benzalkonyum klorit ve klorhekzidine göre çok daha etkilidir.
- ✓ Nistatin tüm konsantrasyon ve temas sürelerinde hücre lizisine neden olmaktadır. Bu sebeple *Candida* üzerinde nistatin ile sodyum hipoklorit etkisi benzerdir.
- ✓ Amfoterisin B, düşük konsantrasyonlarda hücre yüzeyinde belirgin değişikliklere neden olmamaktadır. Amfoterisin B, konsantrasyon arttıkça öncelikle membranda çökme ve por oluşumuna devamında hücre lizisine neden olmaktadır. Amfoterisin B'nin konsantrasyon bağımlı bu etkisi benzalkonyum klorite benzetilmiştir.
- ✓ Her biyosidin *Candida* üzerinde benzer ve farklı etkileri olmaktadır. Bu etkiler membran yüzeyinde pürüzlülüğün artması, hücre boyutunun küçülmesi, çökme, membranda por ve olukların oluşması, hücre içeriğinin boşalması, hücre yüzeyinden parça kopması ve hücre lizisi şeklindedir.
- ✓ Membranda pürüzlülüğün artması biyosidin yüzey üzerinde etkili olduğu anlamına gelmektedir. Fakat, bazı durumlarda hücre yüzeyi düz görünse bile pürüzlülük ölçümlerinde anlamlı değişiklikler görülmüştür.
- ✓ Hücre yüzeyinde meydana gelen tüm morfolojik değişimlerin nedeni biyosid aktivitesi nedeniyle membran geçirgenliğinin artmasına bağlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Dossaji, S., Çelik Ü., Alhan E., Yıldızdaş D. ve Ünal İ. (2008). Nozokomiyal enfeksiyonlar için enfeksiyon belirteçleri. *Çocuk Enfeksiyonları Dergisi*, 2, 12-8.
2. Saniç, A. (2006). Hangi dezenfektan? Nasıl?. *ANKEM Dergisi*, 20(2), 89-93.
3. Aşcıoğlu, S. (2007). Hastane enfeksiyonları. *Türk Hijyen Derneği Biyoloji Dergisi*, 64 (1) Epidemiyoloji Raporu 1.
4. Yücel, A., Kantarcıoğlu, A.S. (2001). Hastane kaynaklı (Nozokomiyal) Mantar İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 32 (4).
5. Şencan, İ. (2003, 02-04 Ekim) *Dezenfektanlara direnç sorunu ve pratikte Önemi*. 3. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresinde sunuldu, Samsun.
6. Özyurt, M. (2000). Dezenfeksiyon ve sterilizasyon yöntemleri. *Klinik Dergisi*, 13, 41-48.
7. Russell, A.D. (1991). Principles of antimicrobial activity, In:Block SS, eds. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, Fourth ed, Philadelphia: Lea Febiger, 29-58.
8. Russell, A.D, Hugo, W.B., Ayliffe, G.A.J. (1982). Principles and practise of disinfection preservation and sterilization. *Blackwell Scientific Publication*, 149-161.
9. Russell, A.D., Furr, J.R. (1996). Biocides: mechanisms of antifungal action and fungal resistance. *Science Progress*, 79(1), 27-48.
10. Eryılmaz, M., Akın, A. (2008). Dezenfeksiyon ve antisepsi. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 37(4), 311-331.
11. McDonnell G., Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147-79.
12. Russell, A. D. (2002). Mechanisms Of Antimicrobial Action Of Antiseptics And Disinfectants: An Increasingly Important Area Of Investigation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(4), 597-599.
13. Jalili, N., Laxminarayana, K.(2004). A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences, *Mechatronics*, 14, 907-945
14. Günaydın, M., Gürler, B. (2008). Hastane infeksiyonları kontrolünde dezenfeksiyon, antisepsi ve sterilizasyon“DAS” uygulamaları. *ANKEM Dergisi*, 22(4), 221-231
15. Saniç, A. (2002). Tıbbi cihaz ve aletlerin sterilizasyon ve dezenfeksiyonunda genel prensipler., M. Günaydın, Ş. Esen, A. Saniç, H. Leblebicioğlu. (Editörler). *Sterilizasyon, Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları*. Samsun: Simad Yayınları, 13-22.

16. Bektaş, T. (2003, 02-04 Ekim). *Ameliyathanede sterilizasyon ve dezenfeksiyon deneyimleri*. 3. Sterilizasyon, Dezenfeksiyon Kongresinde sunuldu, Samsun.
17. Güven, R. (2003, 2-4 Ekim). *Sterilizasyon–dezenfeksiyon konusunda deneyimler: klinik ve Poliklinikler*. 3. Sterilizasyon, Dezenfeksiyon Kongresinde sunuldu, Samsun.
18. Samastı, M. (2008). Hastanelerde dezenfeksiyon kullanım esasları, yapılan Hatalar. *Hastane Enfeksiyonları: Korunma ve Kontrol Sempozyum Dizisi*, 60, 143-168.
19. Gürler, B. (2003, 02-04 Ekim). *Dezenfektan seçimi ve dezenfektanların kullanımı konusunda güncel rehberler*. 3. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresinde sunuldu, Samsun.
20. Günaydın, M., Gürler, B. (2011). Hastane infeksiyonları kontrolünde dezenfeksiyon, antisepsi ve Sterilizasyon“DAS” uygulamaları. *ANKEM Dergisi*, 8-65.
21. Abbasoğlu, U. (2009, 1-5 Nisan). Dezenfektanlar: Sınıflama ve Amaca Uygun Kullanım Alanları. 6. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresinde sunuldu, Antalya.
22. Gürler, B. (1990). Dezenfektan ve antiseptiklerin sınıflandırılması. *ANKEM Dergisi*, 4(3), 358-363.
23. Rutala, W.A. (1996). APIC Guideline for Selection and use of Disinfectant.1994, 1995, and APIC Guidelines Committee.Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc., Am J Infect Control,24(4), 313-342.
24. U.S. Food and Drug Administration (FDA).(2008). Cleared Sterilants and High Level Disinfectants with General Claims for Processing Resuable Medical and Dental Devices. <http://www.fda.gov/cdrh/ODE/germlab.html>. Erişim Tarihi 05.04.2016.
25. Dezenfeksiyon Antisepsi Sterilizasyon (DAS) Derneği. (2008). Sterilizasyon Rehber Taslağı. <http://das.org.tr/tr/dosya/rehber/steril-rehber.zip>. Erişim Tarihi 05.04.2016.
26. Rutala, W.A., Weber, D.J.(2007). Sterilization and disinfection “Jarvis W.R (eds): Bennett and Brachman’s Hospital Infections, 5.Baskı” kitabında 20. Bölüm, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
27. Gürler, B. (2002). Dezenfektan gerekli mi? Ne zaman? Hangi dezenfektan?, M. Günaydın, Ş. Esen, A. Saniç, H. Leblebicioğlu. (Editörler). *Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları*. Samsun: Simad Yayınları, 9-12.
28. Rutala, W.A., Weber, D.J. (2008). Healthcare infection control practices advisory committee. *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities*.
29. Cloete T.E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds, *International Biodeterioration& Biodegradation*, 51, 277-282.
30. Özbakkaloğlu, B. (2003). Hastane ortamında kullanılacak yüzey dezenfektanları. M. Günaydın, M. Sünbül. (Edt). 3. *Sterilizasyon, Dezenfeksiyon Kongresi*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 131-138.

31. Dvorak, G. (2005). Disinfection centre for food security and public health, *Iowa State University*, 1-20.
32. Russell, A.D, Hugo, W.B. and Ayliffe, G.A.J. (1982). Principles and practise of disinfection preservation and sterilization. *Blackwell Scientific Publication*, 205-240.
33. Poole, K. (2002). Mechanism of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal Appl Microbiol.* 92, 55-64.
34. Söğüt, M.Ü. (2013). Jermisid ajanlardan katyonik deterjanlar. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 30, S75-S79.
35. Sökücü, N. (1990). El Hijyeni ve antisepsisi. *ANKEM Dergisi*, 4(3), 379-384.
36. Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber, C. (1986). *Physical Review Letters*, 56, 930–933
37. Hilal, N., Bowen, W.R., Alkhatib, L. and Ogunbi, O. (2006). A review of Atomic force microscopy applied to cell interactions with membranes, *Chemical Engineering Research and Design*, 84(A4), 282–292.
38. Jagtap, R.N., Ambre, A.H. (2006). Overview literature on Atomic Force Microscopy (AFM): Basics and its important applications for polymer characterization, *Indian Journal Engineering & Materials Science*, 13, 368-384
39. Engel, A., Lyubchenko, Y. and Muller, D. (1999). Atomic force microscopy: a powerful tool to observe biomolecules at work, *Trends Cell. Biology*, 9, 77-80
40. Rao, S., Costa, K.D. (2014). Atomic Force Microscopy (AFM) in biomedical research, Morris, P. (Editör). Biomedical imaging: applications and advances. Cambridge: Woodhead Publishing, 41-64.
41. Johnson,D., Hilal, N., Bowen, W.R.(2009). Basic Principles of Atomic Force Microscopy, Bowen, W.R., Hilal, N. (Editörler). Atomic force microscopy in process engineering: introduction to AFM for improved processes and products. Oxford ; Burlington, MA : Butterworth-Heinemann, Butterworth-Heinemann Publishing, 1-29.
42. Vahabi, S., Salman, N., Javanmard, A. (2013). Atomic Force Microscopy Application in Biological Research: A Review Study, *Iran Journal Medical Science*, 38(2).
43. Pereira, R.S. (2001). Atomic Force Microscopy as a Novel Pharmacological Tool. *Biochemical Pharmacology*, 62, 975-983.
44. Alsteens, D., Beaussart, A., El-Kirat-Chatel, S., Sullan, R.M.A. and Dufrene, Y.F. (2013). Atomic Force Microscopy: A New Look at Pathogens, *PLOS Pathogens*, 9, e1003516
45. Edwardson, J.M., Henderson, R.M., (2004). Atomic force microscopy and drug discovery, *Drug Discovery Today*, 9(2), 64-71
46. İnternet: Web: [www.wikibooks.org/Nanotechnology/Scanning probe microscopy](http://www.wikibooks.org/Nanotechnology/Scanning%20probe%20microscopy).

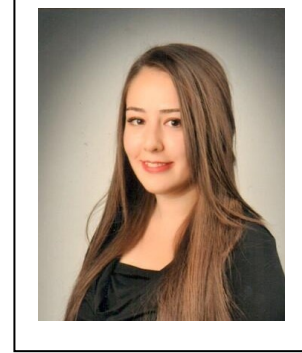
47. Casero, E., Vázquez, L., Parra-Alfambra A.M. and Lorenzo, E. (2010). AFM, SECM and QCM as useful analytical tools in the characterization of enzyme-based bioanalytical platforms, *Analyst*, 135, 1878-1903
48. Internet: Web: <http://www.chemistry.uoguelph.ca/educmat/chm729/afm/details.htm>
49. Jung, S.H., Park, D., Park, J.H., Kim, Y.M. and Ha, K.S. (2010). Molecular imaging of membrane proteins and microfilaments using atomic force microscopy, *Experimental and Molecular Medicine*, 42(9), 597-605
50. Edwardson, J.M., Henderson, R.M. (2004). Atomic Force Microscopy and Drug Discovery. *Drug Discovery Today*, 9(2).
51. Kriznik, A., Bouillot, M., Coulon, J. and Gaboriaud, F. (2005). Morphological specificity of yeast and filamentous *candida albicans* forms on surface properties, *Comptes Rendus Biologies*, 328, 928-935
52. Kim, S.K., Kim, Y., Han, I., Kim, M., Jung, M.H. and Park, H. (2011). Quantitative and qualitative analyses of the cell death process in *candida albicans* Treated by Antifungal, *Plos One*, 6(12), e28176
53. Kim, Y., Kim, S.K., Han, I., Kim, M., Jung, M.H. and Park, H. (2012). Quantitative and qualitative analyses of the antifungal activity of allicin alone in combination with antifungal drugs, *Plos One*, 7(6), e38242
54. Soon, R.L., Nation, R.L., Hartley, P.G., Larson, I. and Li, J. (2009). Atomic force microscopy investigation of the morphology and topography of colistin-heteroresistant *acinetobacter baumannii* strains of as a function of growth phase and in response to colistin treatment, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 4979-4986
55. Li, N., Luo, M., Fu, Y., Zu, Y., Wang, W., Zhang, L., Yao, L., Zhao, C. and Sun, Y. (2013). Effect of corilagin on membrane permeability of *escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, *Phytotherapy Research*, 27, 1517-1523
56. Aytac, S.A., Mercanoğlu, B., Ergun, M.A. and Tan, E. (2003). The visualisation of *Salmonella enteritidis* by atomic force microscopy, *Annals of Microbiology*, 53(3), 337-342
57. Ahimou, F., Touhami, A. and Dufrene, Y.F. (2003). Real-time imaging of the surface topography of living yeast cells by atomic force microscopy, *Yeast*, 20, 25-30
58. Formosa, C., Schiavone, M., Martin-Yken, H., François, M., Duval, E. and Daguea E. (2013). Nanoscale effects of caspofungin against two yeast species, *saccharomyces cerevisiae* and *candida albicans*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), 3498-3506
59. Tyagi, A.M., Malik, A. (2012). Morphostructural Damage in Food-Spoiling Bacteria due to the Lemon Grass Oil and Its Vapour: SEM, TEM and AFM Investigations, Evidence-Based *Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 692625

60. Tyagi, A.M., Malik, A. (2010). SEM, TEM and AFM studies of the antimicrobial activity of lemon grass oil liquid and vapour phase against *candida albicans*, *Micron*, 41, 797-805
61. Qasim, M., Braj R. S., Naqvi, A.H., Paik, P. and Das, D. (2015). Silver nanoparticles embedded mesoporous SiO₂ nanosphere: an effective anticandidal agent against candida albicans 077, *Nanotechnology* 26, 285102 (14pp)
62. Valois, C. R. A., Silva, L. P. and Azevedo, R. B. (2005). Effects of 2% chlorhexidine and 5.25% sodium hypochlorite on gutta-percha cones studied by atomic force microscopy, *International Endodontic Journal*, 38, 425–429
63. İsci, S., Yoldas, O. and Dumani, A. (2006). Effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine solutions on resilon (synthetic polymer based root canal filling material) cones: an atomic force microscopy study, *Journal of Endodontics*, 32(10), 967-969
64. Camposa, D.A., Ribeiro, A.C., Costa, E.M., Fernandes, J.C., Tavaría, F.K., Araruna, F.B., Eiras, C., Eaton, P., Leite J.R.S.A. and Pintado, M.M. (2011). Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum, *Carbohydrate Polymers* 90, 270– 274
65. Gammoudia, I., Mathelie-guinleta, M., Morotea, F., Bevenb, L., Moynetc, D., Grauby-heywanga, C. and Cohen-bouhacinaa, T. (2016). Morphological and nanostructural surface changes in Escherichia coli over time, monitored by atomic force microscopy, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 141, 355–364
66. Ando, T., Uchihashi, T., Kodera, N. (2013). High-speed AFM and applications to biomolecular Systems, *Annual Review of Biophysics*, 42, 393-414

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Merve Erdoğan
 Uyruğu : T.C
 Doğum tarihi ve yeri : 01/06/1989 Ankara
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0506 622 35 45
 e-mail : merveerdogan1689@hotmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Tıbbi Mikrobiyoloji AD	Devam ediyor
Lisans	Ankara Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Ankara Kocatepe Mimar Kemal Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	2007

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Kalkancı, A., Fouad, A. A., **Erdoğan, M.**, Altay, A., Aliyeva, Z., Bozdayı, G., Çağlar, K. (2015). Bazı bakteri ve mantarların virülansının araştırılmasında *Galleria mellonella*'nın in vivo model olarak kullanılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 49(3), 366-376.
2. **Merve Erdoğan**, Ayse Kalkanci, Ali Adil Fouad, Gülsan Sucak, Esin senol, Semra Kustimur. The Assesment of the Direct Effects of Tacrolimus and Cyclosporine on *Candida albicans* 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2014), 2014, Barcelona, Spain

3. Ali Adil Fouad, Murat Dizbay, **Merve Erdoğan**, Kayhan Caglar, Ayse Kalkanci. In vitro antifungal and antibacterial activity of propolis extract. 6th Trends in Medical Mycology Symposium, 2013, Copenhagen, Denmark.
4. **Merve Erdoğan**, Ayşe Kalkancı, Takashi Sugita. Rapamisinin *Candida albicans* salgısal aspartil proteinazları üzerine etkisi. 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 2014, Ankara, Türkiye.
5. **Merve Erdoğan**, Ali Adil Fouad, Ayşe Kalkancı. *Candida albicans* kökenlerinde biyosidlere ve flukonazole duyarlılığın karşılaştırmalı olarak araştırılması. XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 2014, Antalya, Türkiye.
6. Ayşe Kalkancı, Ali Adil Fouad, **Merve Erdoğan**, Nevin Keskin. Mini model of *Scedosporium* infection. *Diversity and Barcoding of Medical Fungi: Novel Achievements and Masterclass*. A meeting of the ISHAM Working Groups on Barcoding and *Scedosporium*. 22-23 Nisan 2014, Holland.
7. Ali Adil Fouad, **Merve Erdoğan**, Ayşe Kalkancı. *Candida albicans* kolonisi içinde dezenfektanlara dirençli karşılaşma mutantlarının oluşturulması, Hastane Enfeksiyonları Kongresi (HIKON), 2016, Antalya, Türkiye.



GAZİ GELECEKTİR...

