

Candida albicans Biyofilm Etkilerinin Değerlendirilmesinde *Galleria mellonella* Larvası Modeli*

Galleria mellonella Larva Model in Evaluating the Effects of Biofilm in *Candida albicans*

Meral KARAMAN¹, Ali ALVANDIAN¹, İ. Hakkı BAHAR¹

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, Turkey.

* Bu çalışmanın bir bölümü, XVII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi (25-29 Mart 2015, Antalya)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 08.11.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 25.01.2017

ÖZ

Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar morbidite ve mortalitede artışlara, ekonomik anlamda ciddi kayıplara neden olan kronik enfeksiyonlardır. *Galleria mellonella* larvası büyük boyutları, uygulama kolaylığı, 15-37°C'de yaşayabilme yeteneği, doğal bağışıklık sisteminin memeliler ile benzer olması gibi, nedenlerle in vivo toksikoloji ve patojenite testleri için güvenilir bir hayvan modeli olarak gösterilmektedir. Bu çalışmada *Candida albicans* biyofilm aktivitesinin etkilerinin, *G.mellonella* larvası modelinde değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Model için hastalık etkeni olarak izole edilen, biyofilm üretimi pozitif (BP) ve negatif (BN) olarak saptanan iki *C.albicans* izolatu kullanıldı. Son larval evrede, 2-2.5 cm uzunluğunda, sağlıklı 80 adet *G.mellonella* larvası eşit olarak 4 gruba ayrıldı (n= 20). Grup 1 sağlıklı kontrol grubu olarak belirlendi. Grup 2'ye steril fosfat tamponu (PBS), grup 3'e BP *C.albicans* izolatu ve grup 4'e BN *C.albicans* izolatu enjekte edildi. PBS ile 5 x 10⁵ cfu/ml yoğunlukta hazırlanan *C.albicans*'ın 5 µl'si larvaların en sondaki sol bacaklarına enjekte edildi. Larvalar, steril petri kutuları içinde 37°C'de bekletildi. İlk 24 saat içinde 4 saat, daha sonra 12 saat ara ile toplam 96 saat süreyle gözlemlendi. Enfeksiyon göstergesi olarak; melanizasyon, sağkalım, toplam hemosit sayısı ve fungal yük değerlendirildi. Çalışma süresince grup 1'de melanizasyon ve ölüm gözlenmedi. Grup 2'de bir larva kaybedildi. *C.albicans* ile enfekte larvalarda 3. saatten itibaren küçük melanizasyon odakları (siyah nokta) ve ardından ilerleyici melanizasyon gözlemlendi. BN *C.albicans* ile enfekte grup ile karşılaştırıldığında, BP *C.albicans* ile enfekte larvalarda 24. saat sonunda sağkalım oranı %20 olarak belirlendi. Toplam hemosit sayıları değerlendirildiğinde enfeksiyon gruplarında grup 1 ve 2'ye göre çok düşük bulundu. Grup 3'de ise hemosit sayısı grup 4'e göre anlamlı olarak düşük saptandı. Kantitatif kültürlerde grup 1 ve 2'de mikroorganizma üremesi saptanmadı. Grup 3 ve 4'de *C.albicans* üre-

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Meral Karaman, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35320, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 412 45 01, **E-posta (E-mail):** meral.karaman@deu.edu.tr

mesi saptandı. BP *C.albicans* ile enfekte grupta, BN *C.albicans* ile enfekte gruba göre fungal yük anlamlı olarak yüksek saptandı. Bu çalışmada, *C.albicans* biyofilm aktivitesinin etkilerinin gösterilmesinde canlı konak olarak *G.mellonella* larvası kullanılmıştır. Sonuçlarımız fungal enfeksiyonların ve biyofilm gibi virülans faktörlerinin konak hücreye etkilerinin araştırılmasında larva modelinin kullanılabileceğini, omurgasız hayvan modellerinin yaygınlaşarak in vitro çalışmalar ile memeli modelleri arasında köprü oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: *Biyofilm; Candida albicans; Galleria mellonella larva; enfeksiyon modeli.*

ABSTRACT

Biofilm-related infections are chronic infections that cause serious increase in morbidity and mortality as well as significant economic loss. *Galleria mellonella* larva is shown as a reliable animal model for in vivo toxicology and pathogenicity tests due to its large size, ease of practice, ability to survive at 15-37°C and its similarity to mammals' natural immune system. The aim of this study was to evaluate the effects biofilm activity of *Candida albicans* in a *G.mellonella* larva model. Two *C.albicans* strains isolated as a disease agent were used for the model, where one was positive (BP), and the other one was negative (BN) for biofilm production. Eighty healthy *G.mellonella* larvae, all in the last larval stage and 2-2.5 cm long, were divided into 4 groups of equal size. Group 1 was set as the control group. Group 2 was injected with sterile phosphate buffer (PBS) group. Group 3 was injected with BP *C.albicans* strain and group 4 with BN *C.albicans* strain. A 5 µL volume of *C.albicans* prepared at 5×10^5 cfu/ml concentration with PBS was injected into the last left rear-legs of the larvae. The larvae were kept in sterile petri dishes at 37°C. They were observed for a total of 96 hours, for 4 hours in the first 24 hours, then in 12 hours intervals. Melanization, survival, total hemocyte count and fungal burden were evaluated as infection indicators. Melanization and death were not observed throughout the study period in group 1. One larva died in group 2. Small melanization spots (dark spots) and subsequent progressive melanization were observed from 3rd hour in the larvae infected with *C.albicans*. When compared with the BN *C.albicans* infected group, survival rate was 20% for BP *C.albicans* infected larvae at the end of 24 hours. Total hemocyte count was very low in the infected groups compared to groups 1 and 2, also significantly lower in group 3 than in group 4. In quantitative cultures, growth of *C.albicans* was detected in groups 3 and 4 while not in groups 1 and 2. Fungal load was significantly higher in BP *C.albicans* infected group than BN *C.albicans* infected group. In this study, *G.mellonella* larvae were used as live hosts to demonstrate the effects of biofilm activity of *C.albicans*. Our results suggest that larval models can be used to investigate the effects of fungal infections and biofilm like virulence factors on host cells, and invertebrate animal models can be widely used and can bridge between in vitro studies and mammalian models.

Keywords: *Biofilm; Candida albicans; Galleria mellonella larva; infection model.*

GİRİŞ

Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar insan vücudunun bir veya daha fazla bölgesinde tıbbi tedaviye yanıt vermeyen, kronik ve tekrarlayıcı tablo ile karakterizedir. Sıklıkla yavaş gelişen bu enfeksiyonlar nadiren ölümle sonuçlanır. İnsan enfeksiyonlarının %65'inin tıbbi aletler ya da konak doku yüzeyinde yerleşmiş olan biyofilm yapımı ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir^{1,2}. Biyofilm yapının temelini oluşturan ekzopolisakkarit (EPS) tabaka içine gömülü mikroorganizmalar, serbest formda (planktonik) hücrelerle kıyaslandığında; fagositoz ve vücudun diğer savunma sistemlerine direncin yanı sıra antibiyotik ve kimyasal dezenfektanlara artmış tolerans özelliği göstermektedirler^{3,4}. Uzun zamandan bu yana

memeliler enfeksiyöz etkenlerin model konakları olarak başarıyla kullanılmaktadırlar⁵. Enfeksiyon hastalıklarının patogenezi anlamak ve onlarla baş edebilmek konusunda bu modeller önemli bilgiler sunmuştur. Ancak günümüzde yasal düzenlemelerin yanı sıra deneylerde memelilerin kullanılmasıyla ilgili artan bilişsel düzey ve hassasiyet, önceleri fare, sıçan gibi etik olarak kabul edilebilir memeli modellerini öne çıkarmıştır. Daha sonra ise, bu modeller için donanımlı laboratuvarlara, deneyimli hayvan bakıcıları ve teknisyenlere ihtiyaç duyulması, yasal yaptırımların ağır olması ve maliyetlerin yüksek oluşu nedeniyle omurgasız hayvan modelleri alternatif olarak yeniden önem kazanmıştır⁶. Büyük balmumu güvesi olarak da adlandırılan *Galleria mellonella* larvası in vivo toksikoloji ve patojenite testleri için güvenilir bir hayvan modeli olarak gösterilmektedir. *G.mellonella* larvası modelinin *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* gibi diğer omurgasız hayvanlar arasında öne çıkmasında; 2-4 cm boyutlarındaki büyüklüğü nedeniyle uygulama kolaylığı, 15-37°C'de yaşayabilme yeteneği nedeniyle de özellikle enfeksiyon patogenezi çalışmalarına uygun olması rol oynamaktadır^{7,8}. Özellikle doğal bağışıklık sisteminin memeliler ile yapısal ve fonksiyonel açıdan benzerliğinin gösterilmesiyle^{7,9} son yıllarda in vivo enfeksiyon modelleri içinde yıldızı parlamıştır¹⁰. Bu çalışmada *Candida albicans*'ın önemli virülans faktörleri arasında yer alan, konak hücre ve yapay hücrelere adezyondan sorumlu biyofilm aktivitesinin etkilerinin, *G.mellonella* larvası modelinde değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

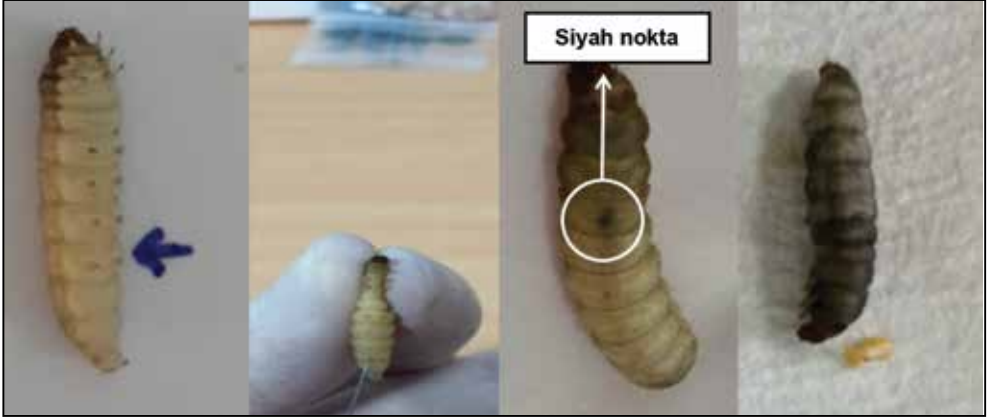
GEREÇ ve YÖNTEM

C.albicans İzolatları

Çalışmada, hastanede yatan hastaların trakeal sekresyon örneklerinden hastalık etkeni olarak izole edilen *C.albicans* izolatları kullanıldı. Biyofilm aktivitesi mikropalakristal viyole boyama yöntemi ile araştırıldı¹¹. Biyofilm pozitif (BP) ve biyofilm negatif (BN) olarak değerlendirilen iki *C.albicans* izolatu enfeksiyon modeli için seçildi. Suşlar 9 mm çaplı plaklara dökülmüş Sabouraud's Dextrose Agar (SDA, Conda, France)'ya ekim yapılarak 24 saat süreyle 35°C'de inkübe edildi. Ertesi gün oluşan koloniler steril öze ile toplanarak "Yeast Peptone Dextrose" sıvı besiyerinde (YPD sıvı besiyeri; %1 maya ekstresi, %2 pepton ve %2 dekstrozu, Conda, Fransa) 30°C'de bir gece bekletildi. Süspansiyon steril fosfat tampon (PBS) ile üç kez yıkandıktan sonra 5×10^5 yoğunlukta hazırlandı¹².

G.mellonella Larvaları ve Enfeksiyon Modeli

Son larval evrede, yaklaşık 2-3 cm uzunluğunda, 250-300 mg ağırlığında, sağlıklı (görsel olarak açık renkli) 80 adet *G.mellonella* larvası steril petri kutularına alındı (Resim 1). Larvalar; Grup 1 (n= 20); sağlıklı kontrol grubu, grup 2 (n= 20); PBS grubu (enjeksiyona bağlı etkileri izlemek için), grup 3 (n= 20); BP *C.albicans* ve grup 4 (n= 20); BN *C.albicans* izolatu ile enfekte grup olmak üzere dört ana gruba ayrıldı. Gruplar kendi içlerinde tekrar iki gruba ayrıldı. Bir grup sağkalım ve sağlık puanlaması için gözlenirken diğer grup hemosit sayılarını ve fungal yükü saptamak amacıyla belirlenen zaman aralıklarında sakrifiye edildi.



Resim 1. Sağlıklı larva, enjeksiyon yeri ve *C.albicans* ile enfekte larvalarda melanizasyonun gelişimi.

C.albicans inokulasyonu için larvalar %70 alkol emdirilmiş steril eküvyon ile silindi. 5×10^5 yoğunluktaki maya suspansiyonunun $5 \mu\text{L}$ 'si larvaların en sondaki sol bacaklarına Hamilton enjektörü ile doğrudan enjekte edildi. PBS grubuna aynı miktarda steril PBS verilirken, kontrol grubuna herhangi bir işlem yapılmadı. Larvalar, buğday kepeği, bal mumu, bal ve gliserol karışımı şeklinde besin içeren ve ağızları kapatılan steril petri kutuları içinde, 37°C 'de bekletildi. Larvalar ilk 24 saat içinde 4 saat, daha sonra 12 saat ara ile toplam 96 saat süreyle gözlemlendi. Tüm deneyler farklı zaman dilimlerinde iki kez tekrarlandı. Omurgasız hayvan çalışmalarında "Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu" onayı gerekmediğinden çalışmamızda etik kurula başvuru yapılmamıştır.

Sağlık Puanlaması

İnokulasyon sonrası 96. saat sonunda larvaların sağlık durumları literatür önerileri doğrultusunda; aktivite, koza formasyonu, melanizasyon (koyu kahve-siyah renk değişimi) ve hayatta kalma kriterlerine göre puanlandı¹³. Puanlama çift göz ile çift kör olarak yapıldı.

Hemosit Sayısının Belirlenmesi

İnokulasyon sonrası 24, 48, 72 ve 96. saat sonunda grup başına 3 adet larvanın hemosit sayılarının belirlenmesi amacıyla larvalar sakrifiye edildi. Sakrifikasyon için buz aküleri üzerinde 3 dakika bekletilen son evre larvaların hareketlerinin yavaşlaması sağlandıktan sonra larva yüzeyi %70 alkol emdirilmiş steril eküvyon ile silindi. Ardından birinci arka bacak üstünden, ince uçlu diseksiyon iğnesi ile delinip $200 \mu\text{L}$ 'lik steril ependorf içine yaklaşık $5 \mu\text{L}$ hemolenf toplandı. Buz üzerinde bekletilen hemolenf, hacminin yaklaşık 10 katı hacimde antikoagülan ile karıştırıldı. Karışımın $10 \mu\text{L}$ 'si Neubauer hemositometresine aktarıldı, Olympus BX51 mikroskopunda bir mililitre hemolenfteki hemosit sayısı belirlendi.

Fungal Yükün Belirlenmesi

Hemolenf alımı sonrası larvalar 1 ml PBS ve 5 mm çapında steril paslanmaz çelik boncuk içeren ependorflara alındı. Ependorflar Tissuelyser LT tüp raflarına alınıp Tissuelyser

(Qiagen-Almanya) doku homojenizasyon cihazına yerleştirildi. Frekans 50, zaman 5 dakikaya ayarlandı. Homojenizasyon işleminin ardından kloramfenikol içeren (100 µg/ml) SDA'ya kantitatif ekim yapılarak plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Fungal yük larva başına düşen koloni oluşturan ünite (cfu/larva) olarak hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

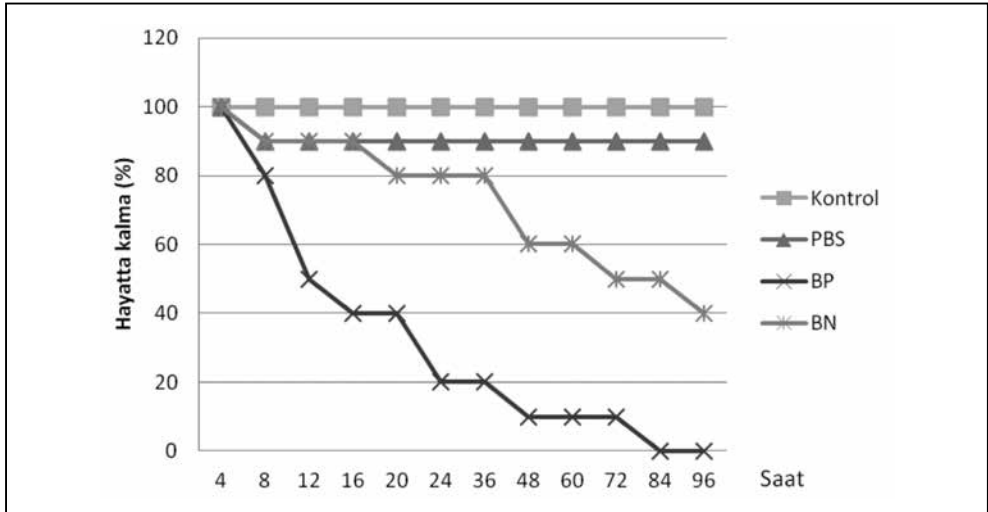
Tüm istatistiksel işlemler SPSS 15.0 istatistik programında yapıldı. İkili grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ alındı. Larvaların sağkalım analizi için Kaplan Meier yöntemi kullanıldı.

BULGULAR

Grup 1 ve 2'de ilk 24 saat içinde melanizasyon ve ölüm gözlenmemiştir. PBS grubunda tüm çalışma boyunca bir larvanın öldüğü gözlenmiştir. *C. albicans* ile enfekte larvalarda 3. saatten itibaren küçük melanizasyon odakları (siyah nokta) ve ardından ilerleyici melanizasyon gözlenmiştir (Resim 1).

Kaplan Meier sağkalım analizi sonucunda grup 4 ile karşılaştırıldığında, grup 3 larvalarda sağkalım açısından anlamlı farklılık belirlenmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 1). BP *C. albicans* ile enfekte grupta 24. saat sonunda sağ kalım oranı %20 olarak bulunmuştur.

Toplam hemosit sayıları değerlendirildiğinde kontrol ve PBS gruplarındaki ortalama hemosit sayıları grup 3 ve 4'e göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. BP *C. albicans* ile enfekte grupta, BN *C. albicans* ile enfekte gruba göre hemosit sayılarının anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Fungal yük açısından bakıldığında ise; yapılan kantitatif kültürlerde grup 1 ve 2'de mikroorganizma üremesi saptanmamıştır. Grup 3 ve 4'de *C. albicans* üremesi saptanmamıştır. BP *C. albicans* ile enfekte grupta, BN *C. albicans* ile enfekte gruba göre fungal yük anlamlı olarak yüksek saptanmamıştır ($p < 0.05$) (Tablo I).



Şekil 1. Gruplara göre canlı larvaların sayısı (Kaplan-Meier sağkalım grafiği).

Tablo 1. İnokulasyon Sonrası 24. Saatte Larvaların Hemosit Sayısı ve Fungal Yük Ortalamaları

Gruplar	Hemosit sayıları ($\times 10^6$ hücre/ml)	Fungal yük ($\times 10^5$ cfu/ml)
1. Kontrol	17.18 $\pm$ 0.31	-
2. PBS	15.71 $\pm$ 0.57	-
3. BP <i>C.albicans</i>	8.17 $\pm$ 1.31	3.52 $\pm$ 0.43
4. BN <i>C.albicans</i>	11.74 $\pm$ 0.64	2.28 $\pm$ 0.36

TARTIŞMA

Fungal biyofilmler özellikle hastanede yatan ve tıbbi implantı olan hastalar için önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Bilindiği gibi, biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar sağlık alanında önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır^{14,15}. Bu nedenle biyofilm yapının fungal patogeneze rolünün ortaya konması ve çeşitli antifungal ajanların etkinliğinin test edilmesi amacıyla in vitro ve in vivo çalışmalar yapılmaktadır. Canlı konak olarak sıklıkla sıçan, fare gibi kemirgenler kullanılmaktadır¹⁶⁻¹⁸. Son yıllarda ise, kemirgenlerle birlikte yapılan karşılaştırmalı araştırmalar sonucunda elde edilen verilerin tutarlılığı nedeniyle omurgasız hayvan *G.mellonella* larvası öne çıkmıştır^{19,20}. Laboratuvarında, oda ısısında, özel sistemlere ihtiyaç duymayan küçük kavanozlarda barındırılabilen ve üretim için etüvlerin kullanılabilirdiği larvalar ucuzdur ve temin etmek kolaydır. Diğer omurgasız modellerine göre büyük boyutları hem etken patojenlerin hem de antimikrobiyal peptidlerin yeterli miktarlarını enjektörle kolayca uygulama olanağı sağlamaktadır^{21,22}. Enfeksiyon patogenezi çalışmaları açısından ise 15-37°C' da yaşayabilme yeteneği önemli bir üstünlüktür⁸. Çalışmamızda da, *C.albicans* ile ilişkili biyofilm enfeksiyonunun etkilerini değerlendirebilmek amacıyla canlı konak olarak *G.mellonella* larvası kullanılmıştır.

Bu modelde hastalık göstergelerinden biri ilerleyici melanizasyondur. Çalışmamızda melanizasyon literatür önerileri doğrultusunda görsel olarak¹³, iki farklı göz tarafından, kör kullanılarak yapılmıştır. Kontrol ve PBS enjekte edilen gruplarda melanizasyon gözlenmezken özellikle BP *C.albicans* ile enfekte grupta 3. saatten itibaren başlayan ve 24. saatte belirginleşen melanizasyon biyofilm aktivitesinin virülansta etkili olduğunu göstermiştir. *G.mellonella* larvasında melanizasyon, hemolenf içinde yer alan hemositler tarafından sentezlenip hücre hasarı ile birlikte kütikülde aktif formuna dönüşen profenoksidaz (PPO) enzimi tarafından gerçekleşmektedir²³. PPO enzim aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesi hastalık sürecinde önemli bir objektif göstergedir²⁴. Çalışmamızda melanizasyon puanlaması ile birlikte PPO enzim aktivitesi kantitatif olarak ölçülebilseydi daha güçlü yorumlar yapmak mümkün olabilirdi.

G.mellonella larvasında hemolenf, hemosit adı verilen bağışıklık sistemi hücrelerinin çeşitli tiplerini içermektedir. Hemositler özellikle patojenlere karşı fagositoz aracılığı ile korunmada etkili rol oynamaktadır^{7,25}. Enfeksiyon modeli çalışmalarında, enfeksiyona karşı bağışıklık yanıtının, konak-patojen etkileşiminin anlaşılmasında hemolenf değerli bir materyaldir. *G.mellonella*'da larva başına yaklaşık 20-50 μ l hemolenf elde edilebilmesi diğer omurgasız hayvan modellerine tercih edilmesinde önemli bir faktördür. Biyofilm

yapı içine gizlenmiş *C.albicans*'ın, konak tarafından farklı sitokinlerin salınımının indüklenmesi ve fagositer hücrelere karşı immün yanıtın hasara uğratılmasında rol oynadığı bildirilmiştir²⁶. Çalışmamızda BP *C.albicans* ile enfekte larvalarda toplam hemosit sayısının BN izolat ile enfekte gruba göre, anlamlı olarak düşük olması literatürde yer alan bu bilgiler ile paralellik göstermiştir^{26,27}. Ayrıca her ne kadar anlamlı bir düşüş olmasa da, PBS enjekte edilen grupta hemosit sayılarının hiçbir girişim yapılmayan kontrol grubuna göre düşük olması strese bağlı olarak bu larvalarda hemosit sayılarının bir miktar düşebildiğini göstermiştir. Bu ayrımı yapabilmek için in vivo modellerde kontrol ve sham grupları büyük önem taşımaktadır. *G.mellonella* larvasında hemolenfin 6 farklı hemosit türü içerdiği, hemosit dansitesi ve hemosit tiplerinin enfeksiyöz etkenlere bağlı olarak farklılıklar gösterdiği bildirilmektedir²⁵. Çalışmamızda gruplar arasında toplam hemosit sayıları açısından belirlenen farklılık biyofilm aktivitesinin virülansta önemli rol oynadığını göstermiştir. Ancak gruplar arasında hemosit türleri açısından farklılık olup olmadığı araştırılmamıştır. Bu konuda yeni çalışmalara ve deneyimli araştırmacılara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, bu çalışmada enfeksiyon göstergelerinden biri olarak melanizasyon ve fungal yükün yanı sıra hemosit sayılarının belirlenmiş olması Kalkancı ve arkadaşlarının benzer bir çalışmasına yenilik getirmiştir²⁸.

Canlı konak modellerinde enfeksiyonun göstergelerinden bir diğeri de mikrobiyal yükün belirlenmesidir. Çalışmamızda bu amaçla larva vücut dokusu kullanılmıştır. Çalışma süresince kontrol ve PBS gruplarında herhangi bir mikroorganizma üremesinin saptanmaması, larvaların sağlıklı olduğunu ve uygulamalar sırasında bir bulaş olmadığını göstermiştir. 24 saat ara ile yapılan sakrifikasyon işlemleri sonucunda amacımız fungal yükteki değişiklikleri zamana bağlı olarak değerlendirmek olmasına rağmen, BP *C.albicans* ile enfekte grupta 24 saat sonunda 2, 48 saat sonunda 1 larva canlı kaldığından ortalama hemosit sayıları ve fungal yük için sadece 24. saat verileri üzerinde yorum yapılabilmiştir. BP *C.albicans* ile enfekte grupta fungal yükün yüksek olması larvalarda gözlenen melanizasyon, hemosit sayıları ve sağkalım ile tutarlılık göstermiş ve bulgularımız literatür ile uyumlu olarak saptanmıştır²⁸. Çalışmamızda literatür önerileri doğrultusunda yaptığımız sağlık puanlamasına göre gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptanmış ancak bu farklılık BP *C.albicans* ile enfekte grupta sağkalım oranlarının düşük olmasından kaynaklandığı için bu veriler paylaşılmamıştır.

Bu bilgiler ışığında fungal enfeksiyonların ve biyofilm gibi virülan faktörlerinin konak hücreye etkilerinin araştırılmasında larva modelinin güvenilir, ucuz ve uygulaması kolay bir model olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Vurgulanan bu üstünlükleri *G.mellonella* larvayı fungal patogeneze ve antifungal ilaç etkinliği çalışmalarında tercih edilir bir model haline getirmiştir. Ancak henüz tüm genom diziliminin bilinmemesi, transgenik modellerinin olmaması, kazanılmış bağışıklık sistemine sahip olmamaları, fungal patogeneze çalışmaları açısından mantar ligandları ile hemosit reseptörleri arasındaki ilişkinin çözülmemiş olması larva modelinin kısıtlılıkları arasındadır^{9,29,30}. Bu bilinmeyenlere yanıt için, hücresel ve moleküler düzeyde ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte; günümüzde omurgasız hayvan modelleri, in vitro çalışmalar ile memeli modelleri arasında bir köprü görevi görebilir, böylece in vivo çalışmalarda daha az sayıda deney hayvanı kullanılmasının yanı sıra maliyet etkin deneyler mümkün olabilir.

TEŞEKKÜR

Kocaeli Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Fevzi Uçkan ve ekibine *G.mellonella* larvalarını temin ettikleri, üretim ve yetiştirme konusunda bilgi ve becerilerini paylaştıkları için teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284(5418): 1318-22.
2. Uppuluri P, Pierce CG, López-Ribot JL. *Candida albicans* biofilm formation and its clinical consequences. *Future Microbiol* 2009; 4(10): 1235-7.
3. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35(4): 322-32.
4. Sun F, Qu F, Ling Y, Mao P, Xia P, Chen H, Zhou D. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future Microbiol* 2013; 8(7): 877-86.
5. Beynen AC, Hau J. Animal models, pp: 197-205. In: Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC (eds). *Principles of Laboratory Animal Science*. 2001, Revised ed. Elsevier, Amsterdam.
6. Vilcinskas A. Insects emerge as valuable model hosts to explore virulence. *Virulence* 2011; 2(5): 376-8.
7. Lionakis MS. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. *Virulence* 2011; 2(6): 521-7.
8. Junqueira JC. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence* 2012; 3(6): 474-6.
9. Hoffmann JA. Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol* 1995; 7(1): 4-10.
10. Karaman M. In vivo enfeksiyon modellerinin yükselen yıldızı: *Galleria mellonella* larvası. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2016; 46(1): 1-7.
11. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985; 22(6): 996-1006.
12. Li DD, Deng L, Hu GH, et al. Using *Galleria mellonella*-*Candida albicans* Infection Model to Evaluate Antifungal Agents. *Biol Pharm Bull* 2013; 36(9): 1482-7.
13. Loh JM, Adenwalla N, Wiles S, Proft T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence* 2013; 4(5): 419-28.
14. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(2): 277-81.
15. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17(2): 255-67.
16. Karaman M, Kiray M, Bayrakal V, Bağrıyanık HA, Yılmaz O, Bahar İH. Experimental oral candidiasis in healthy and immunocompromised BALB/c mice. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(2): 336-43.
17. Ricicová M, Kucharíková S, Tournu H, et al. *Candida albicans* biofilm formation in a new in vivo rat model. *Microbiology* 2010; 156(Pt 3): 909-19.
18. Nett JE, Andes DR. Fungal Biofilms: In vivo models for discovery of anti-biofilm drugs. *Microbiol Spectr* 2015; 3(3). doi:10.1128/microbiolspec. MB -0008-2014.
19. Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 34(2): 153-7.
20. Frenkel M, Mandelblat M, Alastruey-Izquierdo A, Mendlovic S, Semis R, Segal E. Pathogenicity of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal candidiasis assessed in mice and *Galleria mellonella*. *J Mycol Med* 2016; 26(1): 1-8.
21. Cotter G, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 27(2): 163-9.
22. Kavanagh K, Fallon JP. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biol Rev* 2010; 24: 79-83.
23. Soderhall K, Cerenius L. Role of phenoloxidase activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* 1998; 10(1): 23-8.

24. Insua JL, Llobet E, Moranta D, et al. Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*. *Infect Immun* 2013; 81(10): 3552-65.
25. Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28(1): 101-12.
26. Katragkou A, Kruhlak MJ, Simitsopoulou M, et al. Interactions between human phagocytes and *Candida albicans* biofilms alone and in combination with antifungal agents. *J Infect Dis* 2010; 201(12): 1941-49.
27. Bergin D, Brennan M, Kavanagh K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect* 2003; 5(15): 1389-95.
28. Kalkancı A, Fouad AA, Erdoğan M, et al. Using *Galleria mellonella* as an in vivo model to study the virulence of some bacterial and fungal agents. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(3): 366-76.
29. Lionakis MS, Fischer BG, Lim JK, et al. Chemokine receptor Ccr1 drives neutrophil-mediated kidney immunopathology and mortality in invasive candidiasis. *PLoS Pathog* 2012; 8(8): e1002865.
30. Fallon JP, Troy N, Kavanagh K. Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. *Virulence* 2011; 2(5): 413-21.