

# *Candida albicans* ve *Candida parapsilosis* Kompleks İzolatlarının Biyofilm Üretimi Üzerine Farnesol Etkisinin Araştırılması

## Investigation of the Effect of Farnesol on Biofilm Formation by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* Complex Isolates

Berna ERDAL<sup>1</sup>(ID), Bensu BAYLAN<sup>2</sup>(ID), Bahadır BATAR<sup>3</sup>(ID), Ali ÖZTÜRK<sup>4</sup>(ID), Birol TOPÇU<sup>5</sup>(ID)

<sup>1</sup> Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ.

<sup>1</sup> Tekirdağ Namık Kemal University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Tekirdağ, Türkiye.

<sup>2</sup> Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ.

<sup>2</sup> Tekirdağ Namık Kemal University Institute of Health Sciences, Department of Medical Microbiology, Tekirdağ, Türkiye.

<sup>3</sup> Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ.

<sup>3</sup> Tekirdağ Namık Kemal University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Tekirdağ, Türkiye.

<sup>4</sup> Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Niğde.

<sup>4</sup> Niğde Ömer Halisdemir University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Niğde, Türkiye.

<sup>5</sup> Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Tekirdağ.

<sup>5</sup> Tekirdağ Namık Kemal University Faculty of Medicine, Department of Biostatistics, Tekirdağ, Türkiye.

\*Bu çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından NKUBAP.02. YLGA.20.268 proje numarası ile desteklenmiştir.

**Makale Atfı:** Erdal B, Baylan B, Batar B, Öztürk A, Topçu B. *Candida albicans* ve *Candida parapsilosis* kompleks izolatlarının biyofilm üretimi üzerine farnesol etkisinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2024;58(1):49-62.

### ÖZ

*Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların insidansı son otuz yılda önemli ölçüde artmıştır. Kandidozda birinci sırada *Candida albicans* izole edilirken, *Candida parapsilosis* gibi non-*albicans* *Candida* türleri de sıklıkla patojen olarak tanımlanmaktadır. *Candida* enfeksiyonlarının patogeneğinde etkili mekanizmalardan biri olan biyofilm oluşumu nedeniyle tedaviye dirençli enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır. Çoğunluğu algılama [quorum sensing (QS)] sistemi molekülü olan farnesolün *Candida* türlerinin biyofilm yapımı üzerine etki mekanizmaları halen belirsizliğini korumaktadır. Bu çalışmada, *C. albicans* ve *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının farnesol varlığında biyofilm biyokütlesindeki değişiklikler ile QS moleküllerinin sentezinde görev aldığı düşünülen EFG1 ve BCR1 genlerinin kantitatif ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu [quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR)] ile gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya farklı klinik örneklerden izole edilen *C. albicans* (n= 91) ve *C. parapsilosis* kompleks (n= 29) izolatları dahil edilmiştir. Farnesolün minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical Laboratory Standards Institution (CLSI)] M27-A3 kılavuzu kullanılarak sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. İzolatların farnesolsüz, farnesolün MİK-0 ve MİK-2 konsantrasyonlarındaki biyofilm biyokütleleri incelenmiştir. Biyofilm ile ilişkili EFG1 ve BCR1 genlerinin ifadelerindeki değişiklikler qRT-PCR ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, *C. albicans* izolatlarının %82.4 (n= 75)'ünde farnesol MİK değerleri 1-2 mM aralığındaki konsantrasyonlarda sap-

tanırken, *C.parapsilosis* kompleks izolatlarının %72.4 (n= 21)'ünde 0.5-1 mM aralığında bulunmuştur. *C.albicans* izolatlarının %29.7 (n= 27)'si kuvvetli biyofilm, %63.7 (n= 58)'si zayıf biyofilm oluştururken, *C.parapsilosis* kompleks izolatları için bu oranların sırasıyla %34.4 (n= 10) ve %62.1 (n= 18) olduğu bulunmuştur. Kuvvetli biyofilm oluşturan *C.albicans* (n= 24, %88.9) ve *C.parapsilosis* kompleks (n= 8, %80.0) izolatlarında farnesolün MİK-0 ve MİK-2 konsantrasyonlarının biyofilm biyokütlesini azalttığı, zayıf biyofilm oluşturan *C.albicans* (n= 35, %60.3) ve *C.parapsilosis* kompleks (n= 10, %55.6) izolatlarında ise arttırdığı gözlenmiştir. Biyofilm deneyi sonuçlarını destekleyen qRT-PCR çalışması sonucunda; kuvvetli biyofilm yapan *C.albicans* ve *C.parapsilosis* kompleks izolatlarında farnesolün MİK-0 ve MİK-2 konsantrasyonlarında EFG1 ve BCR1 gen ifadelerinde azalış olduğu ancak zayıf biyofilm yapan izolatlarda gen ifadelerinde artış olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma farnesolün *Candida* türleri üzerine antifungal etkisine ek olarak farnesolün MİK-0 ve MİK-2 konsantrasyonlarının *Candida* biyofilm biyokütlesine karşı etkinliğine ait veriler sunmaktadır. Sonuçlar, farnesolün *Candida* enfeksiyonlarının biyofilm oluşumunu azaltmak için alternatif bir ajan olarak kullanılabileceğini düşündürse de yapılacak başka çalışmalar ile bu sonuçların desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca bu çalışma farnesol varlığında *C.parapsilosis* kompleks izolatlarının EFG1 ve BCR1 gen ifadelerini belirlemek adına yapılan ilk çalışma olması açısından önemlidir.

**Anahtar kelimeler:** *Candida*; biyofilm; farnesol; EFG1; BCR1.

## ABSTRACT

The incidence of infections caused by *Candida* species has significantly increased over the past three decades. *Candida albicans* is commonly recognized as the primary causative agent in cases of candidiasis; however, non-*albicans* *Candida* species, including *Candida parapsilosis*, are also frequently defined as pathogens. Treatment-resistant infections arise as a result of biofilm formation, which is one of the effective mechanisms in the pathogenesis of *Candida* infections. However, the mechanisms of action of farnesol, a quorum sensing (QS) system molecule, on biofilm formation by *Candida* species remain unclear. This study aimed to demonstrate the changes in the biofilm biomass of *C.albicans* and *C.parapsilosis* complex isolates in the presence of farnesol and reveal the expression of the EFG1 and BCR1 genes, which are believed to play a role in the production of QS molecules, using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis. *C.albicans* (n= 91) and *C.parapsilosis* complex (n= 29) isolates obtained from different clinical samples were included in the study. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of farnesol were determined using the broth microdilution method according to the M27-A3 protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The biofilm biomass of the isolates was examined without farnesol and at the MIC-0 and MIC-2 concentrations of farnesol. Changes in the expression of the biofilm-associated EFG1 and BCR1 genes were investigated using qRT-PCR. According to the results of the study, the MIC values of farnesol were detected in the range of 1-2 mM in 82.4% (n= 75) of the *C.albicans* isolates and in the range of 0.5-1 mM in 72.4% (n= 21) of the *C.parapsilosis* complex isolates. Of the *C.albicans* isolates, 27 (29.7%) exhibited a strong biofilm formation and 58 (63.7%) demonstrated a weaker biofilm formation, while these rates were 34.4% (n= 10) and 62.1% (n= 18), respectively, for the *C.parapsilosis* complex isolates. At the MIC-0 and MIC-2 concentrations, farnesol was observed to reduce biofilm biomass among *C.albicans* (n= 24, 88.9%) and *C.parapsilosis* complex (n= 8, 80.0%) isolates that formed strong biofilms and observed to increase biofilm biomass among those that formed weak biofilms [60.3% (n= 35) and 55.6% (n= 10), respectively]. On completion of the qRT-PCR analysis supporting the results of the biofilm experiment, it was determined that the expressions of the EFG1 and BCR1 genes decreased at the MIC-0 and MIC-2 concentrations of farnesol among the strong biofilm-forming *C.albicans* and *C.parapsilosis* complex isolates, but there was an increase in gene expressions among the weak biofilm-forming isolates. In addition to the antifungal effect of farnesol on *Candida* species, this study provided data on the efficacy of the MIC-0 and MIC-2 concentrations of farnesol against *Candida* biofilm biomass. Although our results suggest that farnesol can be used as an alternative agent to reduce biofilm formation in *Candida* infections, they need to be supported by further studies. Moreover, this research has significance as it represents the first study to determine the EFG1 and BCR1 gene expressions among *C.parapsilosis* complex isolates in the presence of farnesol.

**Keywords:** *Candida*; biofilm; farnesol; EFG1; BCR1.

## GİRİŞ

*Candida* türleri özellikle immünsuprese hastalarda yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden nozokomiyal mantar enfeksiyonlarının en yaygın nedenidir. Enfeksiyonlara neden olan en önemli tür, insanlarda genital sistem ve bağırsak mikrobiyotasının bir üyesi olan *C.albicans*'tır<sup>1,2</sup>. Son yıllarda *C.albicans* dışında *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.krusei* ve *C.guillermontii* gibi non-*albicans* *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar da sıklıkla bildirilmektedir. Nozokomiyal invaziv enfeksiyonların %90'ından fırsatçı *Candida* türleri sorumlu tutulmaktadır<sup>3-5</sup>. Ayrıca *Candida* türleri, kan dolaşımı enfeksiyonlarının dördüncü en yaygın nedeni olarak bildirilmiştir. *C.parapsilosis* genellikle kan kültürlerinden izole edilen en yaygın ikinci *Candida* türüdür<sup>5</sup>.

*Candida* türlerinin etken olduğu hastalıkların çoğu biyofilm oluşumundan kaynaklanmaktadır. Kandidoz patogeneze katkıda bulunan biyofilmlerin oluşumu tedaviyi zorlaştırmakta ve buna bağlı ortaya çıkan antifungal direnç, bu türlerin neden olduğu enfeksiyonların mortalite ve morbidite oranlarında artışa neden olmaktadır<sup>2,3</sup>.

*C.albicans*'ta altı ana transkripsiyon faktörünün (Efg1, Tec1, Bcr1, Ndt80, Rob1, Brg1) hem in vitro hem de in vivo biyofilm gelişimini düzenlediği bilinmektedir. Efg1, biyofilm oluşumunda önemli işleve sahip genlerin ifadelerinin düzenlenmesinde ve hif oluşumunun desteklenmesinde rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür<sup>6</sup>. *EFG1* defektli *C.albicans* mutantlarında, hif dönüşümünün olmadığı ve buna bağlı olarak biyofilm oluşturmamaları görülmüştür<sup>7</sup>. Transkripsiyon faktörü Bcr1 ise, adhezin düzenleyici olarak biyofilm oluşumunda önemli bir role sahiptir. Özellikle Als3 gibi bazı hücre duvarı proteinlerinin gen ifadesi için Bcr1'in gerekli olduğu bilinmektedir<sup>8</sup>.

*Candida* patojenitesine katkıda bulunan en önemli virülans faktörlerinden biri olan biyofilmler, çoğunluğu algılama [quorum sensing (QS)] sinyal molekülleri tarafından kontrol edilen özgül topluluklardır<sup>4,9</sup>. *Candida*'da tanımlanan ilk QS molekülü olan farnesol, aynı zamanda ökaryotik bir organizmada tanımlanan ilk QS molekülüdür<sup>4,10</sup>. Farnesol, günümüze kadar en çok çalışılan molekül olmasına rağmen, *Candida* türlerinin biyofilm yapımı üzerine etki mekanizmalarının neler olduğu hala belirsizliğini korumaktadır<sup>10,11</sup>. Farnesolün, *Candida*'ların hif oluşumuna özgü genlerin ifadelerini baskılayarak biyofilm gelişimini etkilediği ileri sürülmektedir<sup>11-13</sup>. Bu nedenle farnesolün antifungal terapi ile sinerjistik etki gösterdiği ve yardımcı terapötik ajan olarak kullanılabileceği önerilmiştir<sup>10</sup>.

Farnesolün *C.albicans* ve *C.parapsilosis* kompleks izolatlarının biyofilm yapımı üzerine etkilerini moleküler düzeyde araştıran çalışmalar bulunmaktadır<sup>4,9,13</sup>. Ancak literatürde farnesol varlığında *C.parapsilosis* kompleks izolatlarının *EFG1* ve *BCR1* gen ifadelerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Hala güncelliğini koruyan bu alana katkı sağlayacağını düşündüğümüz bu çalışmada biyofilm yapma dereceleri belirlenmiş, *C.albicans* ve *C.parapsilosis* kompleks izolatlarının farnesol varlığında biyofilm biyokütlesindeki değişiklikler ile biyofilm yapımında görev aldığı düşünülen *EFG1* ve *BCR1* genlerinin kantitatif ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu [quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR)] ile gösterilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 29.03.2022 ve Karar No: 2020.90.04.14).

### *Candida* spp. İzolatları ve Kültür Koşulları

Çalışmaya farklı klinik örneklerden izole edilen 91 *C.albicans* ve 29 *C.parapsilosis* kompleks izolatları dahil edildi. Klinik izolatlar, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan elde edildi. Çalışmada *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.parapsilosis* ATCC 22019 referans suşları kullanıldı. Tüm izolatlar VITEK 2 (BioMérieux, Fransa) sistemi kullanılarak tanımlandı ve -80 °C'de muhafaza edildi. İzolatların her deneyden önce 48 saat boyunca 37 °C'de Sabouraud dekstroza agar (SDA) besiyerine pasajları yapıldı.

### Antifungal Duyarlılık Testi

Farnesolün (Sigma-Aldrich, Almanya) antifungal aktivitesi Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical Laboratory Standards Institution (CLSI)] M27-A3 kılavuzu önerilerine göre 96 kuyucuklu U tabanlı mikrop plaklarda sıvı mikrodilüsyon (BMD) yöntemiyle test edildi<sup>14</sup>. Farnesol, bikarbonatsız, L-glutamin ve %0.2 glukoz içeren RPMI-1640 besiyerinde (Biological Industries, ABD) 16-0.03 mM konsantrasyon aralığında seyreltilerek her kuyucukta 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Kuyucuklara  $0.5-2.5 \times 10^3$  cfu/mL'ye ayarlanmış 100 µl maya süspansiyonları eklendikten sonra mikrop plaklar 24 saat 35 °C'de inkübe edildi. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri görsel olarak değerlendirildi. Maya üremesinin tam (%100) inhibe olduğu kuyucuk MİK-0, bulanıklıkta belirgin azalmanın (~%50) olduğu kuyucuk MİK-2 olarak kabul edildi.

Minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) değerini belirlemek için, MİK değerinin iki ve dört katı olacak şekilde 2 µl kuyucuklardan alınarak SDA'ya ekimi yapıldı. Maya üremesi olmayan en düşük konsantrasyonlar MFK değeri olarak belirlendi<sup>15</sup>. Her izolat üç kez test edildi.

### In vitro Biyofilm Oluşturma Deneyi

*Candida* biyofilm oluşturma deneyi, Melo ve arkadaşlarının<sup>16</sup> tarif ettiği yöntem uyarılarak 96 kuyucuklu düz tabanlı mikrop plaklarda gerçekleştirildi. Biyofilm oluşumları farnesolsüz, farnesolün MİK-0 ve MİK-2 konsantrasyonlarında olmak üzere üç farklı koşulda incelendi. Maya süspansiyonları RPMI-1640 besiyerinde 0.5 McFarland ( $10^6$  cfu/mL) olacak şekilde hazırlandı ve bir gece boyunca 35 °C'de 150 rpm'de dönen bir çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda beş dk 3000xg'de 15 °C'de santrifüjlenerek toplanan maya hücreleri iki kez fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Süspansiyonun optik yoğunluğu, Jin ve arkadaşlarının<sup>17</sup> yaptığı gibi 520 nm'de 0.38'e ayarlanarak  $1 \times 10^7$  cfu/mL'lik maya süspansiyonları hazırlandı. Biyofilm oluşumu için 200 µl maya süspansiyonu düz tabanlı 96 kuyucuklu mikrop plaklara her izolat için üç kuyucuk olacak

şekilde aktarıldı. Hücrelerin kuyucuk yüzeyine yapışabilmesi için mikropalaklar, 37 °C'de iki saat 80 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. Bağlanma aşamasının ardından bağlanmış hücreler bir kez PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 200 µl taze RPMI-1640 besiyeri eklendi ve mikropalaklar biyofilmlerin gelişmesi için 37 °C'de 72 saat 80 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. Negatif kontrol olarak her mikropalağın son üç kuyucuğuna sadece RPMI-1640 besiyeri eklendi.

Biyofilimde oluşan biyokütlenin ölçümü için kristal viyole yöntemi Pumeesat ve arkadaşlarının çalışması<sup>18</sup> modifiye edilerek yapıldı. Biyofilm oluşumundan sonra, her kuyucuk iki kez 200 µl PBS ile yıkandı ve mikropalaklar 20 dakika 35 °C'de kurutuldu. Yıkanan biyofilmler 45 dakika süreyle 200 µl %0.04 kristal viyole çözeltisi ile boyandı. Boyanan kuyucuklar üç kez 200 µl PBS ile yıkandı ve 200 µl %95 etanol eklenerek 45 dakika süreyle hücrelere bağlanan boyanın geri çözündürülmesi sağlandı. Süre sonunda mikropalakların optik dansitesi (OD) 595 nm'de spektrofotometre cihazı (Thermo Fisher Scientific Multiskan Go, ABD) ile ölçüldü. Biyofilm üretim miktarları, üç testin absorbans değerlerinin aritmetik ortalaması alınarak hesaplandı. Negatif kontrol kuyucuklarının OD değerlerinin ortalaması alındı ve üç standart derivasyonu hesaplanarak cut-off OD (OD<sub>c</sub>) değeri belirlendi. Elde edilen cut-off değerine göre biyofilm pozitiflikleri (OD ≤ OD<sub>c</sub>= negatif, OD<sub>c</sub> < OD ≤ 2xOD<sub>c</sub>= zayıf, 2xOD<sub>c</sub> < OD ≤ 4xOD<sub>c</sub>= orta, 4xOD<sub>c</sub> < OD= kuvvetli) yorumlandı<sup>19</sup>. Biyofilm deneyleri üç farklı günde tekrar edildi.

### **Candida Biyofilm Biyokütlesi Oluşumu Üzerine Farnesolün Etkisi**

Biyofilm oluşum aşamalarını takiben adezyon fazından sonra süpernatant uzaklaştırılarak önceden belirlenmiş MİK-0 ve MİK-2 farnesol konsantrasyonlarından 200 µl mikropalak kuyucuklarına aktarıldı. Her test için farnesol içermeyen pozitif kontrol ve maya içermeyen negatif kontrol kuyucukları hazırlandı. Mikropalaklar 37 °C'de 72 saat 80 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. Biyofilmler, daha önce yukarıda anlatıldığı gibi kristal viyole boyama yöntemiyle değerlendirildi<sup>18</sup>.

### **qRT-PCR ile Gen İfadelerinin İncelenmesi**

Biyofilm ile ilişkili genlerin (*EFG1*, *BCR1*) ifadelerindeki değişiklikleri araştırmak için qRT-PCR yapıldı ve analiz edildi. Bu genlerin ifadeleri *ACT1* seviyeleri ile normalize edildi. *C.albicans* ve *C.parapsilosis* kompleks izolatlarından iki zayıf, iki kuvvetli biyofilm yapan ve birer referans suş (*C.albicans* ATCC 10231 ve *C.parapsilosis* ATCC 22019) olmak üzere toplam 10 adet izolatta gen ifadeleri ölçüldü. *C.albicans* ve *C.parapsilosis* kompleks biyofilmleri, hücre kültürü flasklarında hem farnesol ile muamele edilmiş (MİK-0 ve MİK-2 konsantrasyonlarda) hem de muamele edilmemiş koşullar altında daha önce yapılan bir çalışmadan uyarlanarak üretildi<sup>20</sup>. Kısaca, her izolat için üç adet 25'lik hücre kültürü flasklarında 10 ml RPMI-1640 besiyerine biyofilm deneyinde anlatıldığı şekilde hazırlanan 1 x 10<sup>7</sup> cfu/mL maya süspansiyonu eklendi. Flasklar, adezyonu sağlamak için iki saat süreyle 80 rpm'de inkübe edildi. Besiyeri uzaklaştırılarak flasklar, farnesolün MİK-0 ve MİK-2 konsantrasyonlarında ve farnesolsüz hazırlanmış 10 ml taze RPMI-1640 ile 72 saat 37 °C 80 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası biyofilmler steril bir kazıyıcı ile flasktan alınarak

beş dk 3000xg'de 15 °C'de santrifüjlenerek toplandı. İki kez DNaz RNaz içermeyen su ile yıkama yapılarak üst sıvı uzaklaştırıldı. Çökelti üzerine 40 µl proteinaz K eklenerek pipet ile karıştırıldı ve 30 dk 37 °C inkübasyona bırakıldı. Total RNA, "high pure RNA isolation kit (Roche, İsviçre)" kullanılarak izole edildi. İzolasyondan sonra, "NanoDrop Spektrofotometre (ALLSHENG Nano-100)" kullanılarak konsantrasyonu ve saflığı ölçülen toplam RNA'lar -80 °C'de muhafaza edildi. Her bir total RNA örneği, 200 ng olacak şekilde hesaplanarak bir "Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche, İsviçre)" kullanılarak üreticinin talimatlarına göre komplementer DNA (cDNA)'ya ters kopyalandı. Kısaca, 200 ng RNA hesabı yapılarak hacim 13 µl olacak şekilde 2 µl "random hexamer primer" (600 pmol/µl) ve değişen miktarda PCR grade su eklendi. Takiben, 4 µl "transcriptor reverse transcriptase reaction buffer (5x)", 2 µl dNTP karışımı (10 mM her birinden), 0.5 µl "transcriptor reverse transcriptase (20 U/µl)" ve 0.5 µl protector RNase inhibitör (40 U/µl) içeren bir karışım hazırlandı ve toplam hacim 20 µl'ye tamamlandı. Isı döngü cihazında (Bio-Rad T100) 10 dk 25 °C, 30 dk 55 °C, beş dk 85 °C ve 4 °C ∞ olacak şekilde reaksiyon kuruldu. Sentezlenen cDNA'lar kullanıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Hedef genlerin ifadeleri, LightCycler 2.0 sistemi kullanılarak analiz edildi. RT-PCR, "FastStart Essential DNA Green Master Mix (Roche, İsviçre)" protokolü kullanılarak gerçekleştirildi. qRT-PCR'de kullanılan primer dizileri Tablo I'de verildi.

Çalışmada, eşik döngüsü (Ct) değerleri real-time PCR cihazı kullanılarak belirlendi. ΔCt yönteminde, her bir örnek için hedef gen ve referans gen (housekeeping gen) Ct değerleri arasındaki fark kullanıldı ( $\Delta Ct = C_{t_{\text{hedef gen}}} - C_{t_{\text{referans gen}}}$ ). Hedef genlerin ifadesi,  $2^{-\Delta Ct}$  formülüne göre saptandı<sup>24</sup>.

### İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde SPSS v25.0 (IBMCorp., Armonk, NY, ABD) programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verildi. qRT-PCR çalışmasında gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar Kruskal-Wallis analizi ile alt grup karşılaştırmaları ise Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi ile test edildi.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

**Tablo I.** qRT-PCR Yönteminde Kullanılan Primer Dizileri

| Genler      | Primerlerin nükleotid dizileri (5'→3')                                     |                                                                  | Kaynaklar |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------|
|             | <i>C.albicans</i>                                                          | <i>C.parapsilosis</i> kompleks                                   |           |
| <i>ACT1</i> | F - ACG GTA TTG TTT CCA ACT GGG ACG<br>R - TGG AGC TTC GGT CAA CAA AAC TGG |                                                                  | 21        |
| <i>EFG1</i> | F - ACG AGT AAC AAC TAC CAT<br>R - TAT CTG CTC TTC TGA CAA                 | *F - TCA GGC GGT TCA TAC TAT<br>*R - TTG TGC TTG TTG TTG GTA     | 22        |
| <i>BCR1</i> | F - ATT GCC ACC AAT ACC TGC TC<br>R - GGC TGT CCA TGT TGT TGT TG           | F - ACC ACT ACA GGG ACA GCC AT<br>R - AAG AAT TGG CGT TAC CGG CG | 21,23     |

\**Candida parapsilosis* kompleks *EFG1* için primer dizisi çifti PrimerBLAST'da tasarlanmıştır.

## BULGULAR

Çalışmaya 91 *C.albicans*, 29 *C.parapsilosis* kompleks klinik izolatu dahil edilmiştir. *C.albicans* sırasıyla kan (n= 23), idrar (n= 16), üst solunum yolu (n= 21), balgam (n= 12), yara (n= 9) ve diğer (vajen, periton ve beyin omurilik sıvısı; n= 10) örneklerden izole edilirken; *C.parapsilosis* kompleks kan (n= 16), idrar (n= 7) ve diğer (periton, tırnak, deri ve üst solunum yolu; n= 6) örneklerden izole edilmiştir. Her iki türün de en çok kan örneklerinden izole edildiği görülmüştür.

*C.albicans* izolatlarının 75 (%82.4)'inde farnesol MİK değerleri 1-2 mM aralığındaki konsantrasyonlarda saptanırken, *C.parapsilosis* kompleks izolatlarının 21 (%72.4)'inde 0.5-1 mM aralığında bulunmuştur. *C.albicans* (n= 80, %87.9) ve *C.parapsilosis* kompleks (n= 24, %82.6) için MFK değerleri 1-4 mM aralığında tespit edilmiştir (Tablo II). *C.albicans* ATCC 10231 MİK/MFK değerleri 0.5/0.5 mM bulunurken, *C.parapsilosis* ATCC 22019 MİK/MFK değerleri 1/2 mM bulunmuştur. Test edilen planktonik *Candida* izolatlarına ait MİK ve MFK değerleri Tablo II'de verilmiştir.

*C.albicans* izolatlarının 27 (%29.7)'sinin, *C.parapsilosis* kompleks izolatlarının ise 10 (%34.4)'unun kuvvetli biyofilm yaptığı belirlenmiştir (Tablo III). Kuvvetli biyofilm yapan 11 (%47.8) *C.albicans* ve yedi (%43.7) *C.parapsilosis* kompleks izolatu kan örneklerinden izole edilmiştir. *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.parapsilosis* ATCC 22019 referans suşlarının kuvvetli biyofilm yaptığı tespit edilmiştir.

**Tablo II.** Test Edilen Planktonik *Candida* İzolatlarının MİK ve MFK Değerlerinin Farnesol Konsantrasyonlarına Göre Dağılımı

| Farnesol Konsantrasyonları (mM) | <i>C.albicans</i> , n (%) |                 | <i>C.parapsilosis</i> kompleks, n (%) |                 |
|---------------------------------|---------------------------|-----------------|---------------------------------------|-----------------|
|                                 | MİK                       | MFK             | MİK                                   | MFK             |
| 8                               | 1 (1.1)                   | 5 (5.5)         | 0 (0)                                 | 3 (10.4)        |
| 4                               | 4 (4.4)                   | 24 (26.4)       | 2 (6.8)                               | 6 (20.6)        |
| 2                               | 45 (49.5)                 | 43 (47.2)       | 3 (10.4)                              | 11 (37.9)       |
| 1                               | 30 (32.9)                 | 13 (14.3)       | 13 (44.8)                             | 7 (24.1)        |
| 0.5                             | 5 (5.5)                   | 3 (3.3)         | 8 (27.6)                              | 1 (3.5)         |
| 0.25                            | 3 (3.3)                   | 2 (2.2)         | 3 (10.4)                              | 1 (3.5)         |
| 0.125                           | 3 (3.3)                   | 1 (1.1)         | 0 (0)                                 | 0 (0)           |
| <b>Toplam</b>                   | <b>91 (100)</b>           | <b>91 (100)</b> | <b>29 (100)</b>                       | <b>29 (100)</b> |

**Tablo III.** *Candida* İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Düzeylerine Göre Dağılımı

| İzolatlar                      | Biyofilm Oluşturma Düzeyi |              |                |               |
|--------------------------------|---------------------------|--------------|----------------|---------------|
|                                | Kuvvetli, n (%)           | Zayıf, n (%) | Negatif, n (%) | Toplam, n (%) |
| <i>C.albicans</i>              | 27 (29.7)                 | 58 (63.7)    | 6 (6.6)        | 91 (100)      |
| <i>C.parapsilosis</i> Kompleks | 10 (34.4)                 | 18 (62.1)    | 1 (3.5)        | 29 (100)      |

**Tablo IV.** Farnesolün MİK-0 ve MİK-2 Konsantrasyonlarında *Candida spp.*'lerin Biyofilm Oluşturma Düzeylerindeki Değişimler

| İzolatlar                      | Kuvvetli Biyofilm Oluşturma, n (%) |           | Toplam, n (%) | Zayıf Biyofilm Oluşturma, n (%) |           | Toplam, n (%) |
|--------------------------------|------------------------------------|-----------|---------------|---------------------------------|-----------|---------------|
|                                | Artış                              | Azalış    |               | Artış                           | Azalış    |               |
| <i>C.albicans</i>              | 3 (11.1)                           | 24 (88.9) | 27 (100)      | 35 (60.3)                       | 23 (39.7) | 58 (100)      |
| <i>C.parapsilosis</i> Kompleks | 2 (20.0)                           | 8 (80.0)  | 10 (100)      | 10 (55.6)                       | 8 (44.4)  | 18 (100)      |

Farnesolsüz ortamda kuvvetli biyofilm oluşturan 24 (%88.9) *C.albicans* ve sekiz (%80.0) *C.parapsilosis* kompleks izolatlarında, farnesolün MİK-0 ve MİK-2 konsantrasyonlarının biyofilm biyokütlesini azalttığı tespit edilmiştir. Zayıf biyofilm oluşturan izolatların (*C.albicans* n= 35, %60.3; *C.parapsilosis* kompleks n= 10, %55.6) ise farnesolün MİK-0 ve MİK-2 konsantrasyonlarında biyofilm biyokütleleri artmıştır (Tablo IV). Kuvvetli biyofilm oluşturan *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.parapsilosis* ATCC 22019'un biyofilm biyokütlesinin farnesol varlığında azaldığı saptanmıştır.

Her iki *Candida* türü için iki zayıf, iki kuvvetli biyofilm yapan izolat seçilmiştir. Farnesolsüz, farnesolün MİK-0 ve MİK-2 konsantrasyonlarında biyofilm ile ilişkili genlerin ifadelerindeki değişiklikler Tablo V'te gösterilmiştir.

Farnesolün MİK-0 ve MİK-2 konsantrasyonlarındaki gen ifadelerinin farnesolsüz ortamdaki gen ifadelerine göre farklı olduğu belirlenmiştir ( $\alpha < 0.01$ ). Zayıf biyofilm yapan *C.albicans* ve *C.parapsilosis* kompleks izolatlarında farnesolün MİK-0 ve MİK-2 konsantrasyonlarında *EFG1* ve *BCR1* gen ifadelerinde artış olduğu, ancak kuvvetli biyofilm yapan izolatlarda gen ifadelerinde azalış olduğu görülmüştür. Kuvvetli biyofilm yapan bir izolat dışında (375 numaralı izolat) gen ifadelerindeki artış ve azalışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.01$ ).

## TARTIŞMA

*Candida* türlerine bağlı enfeksiyonlar son yıllarda önemli derecede yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. *Candida* türleri konak hücre ve dokularına veya kateter, yapay eklem, protez kalp kapağı gibi yüzeylere yapışıp biyofilm üreterek kolonizasyon ve enfeksiyon oluşturabilirler<sup>1,25</sup>. Özellikle kan kültürlerinden izole edilen *Candida* izolatlarının, diğer klinik örneklerden izole edilen izolatlara göre daha yüksek oranda biyofilm oluşturduğu bildirilmektedir<sup>1</sup>. Bu çalışmada kuvvetli biyofilm oluşturan *C.albicans* (%47.8) ve *C.parapsilosis* kompleks (%43.7) izolatlarının neredeyse yarısının kan örneklerinden izole edildiği saptanmıştır. Demirbilek ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada<sup>1</sup>, biyofilm oluşturan suşların yaklaşık üçte birinin (11/33) kan kültürü izolatları olduğu ve bu suşların diğer bölgelerden izole edilenlere göre daha yüksek oranda biyofilm oluşturduğu bulunmuştur.

Tablo V. *Candida spp.*'lerde EFG1 ve BCR1 Gen İfadeleri Üzerine Farnesolün Etkisi

| İzolatlar    | EFG1 (Ortalama ± Standart Sapma) |                                  |                                     | BCR1 (Ortalama ± Standart Sapma) |                        |                                  |                                     |        |
|--------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------|
|              | Farnesolsüz<br>(F'süz)           | Mik-0                            | Mik-2                               | p                                | Farnesolsüz<br>(F'süz) | Mik-0                            | Mik-2                               | p      |
| 705*         | 5.1E-3 ±<br>0.1E-1               | 2.3E-2 ±<br>0.2E-1               | 0.4E-1 ±<br>0.1E-1 <sup>b1</sup>    | < 0.01                           | 0.2E-5 ±<br>0.1E-6     | 2.3E-5 ±<br>0.5E-5               | 1.5E-4 ±<br>3.4E-5 <sup>b1</sup>    | < 0.01 |
| 796*         | 1.3E-2 ±<br>0.2E-1               | 6.1E-2 ±<br>0.4E-1               | 0.1 ± 0.1E-<br>1 <sup>b1</sup>      | < 0.01                           | 1.6E-5 ±<br>0.3E-5     | 4.7E-5 ±<br>0.2E-5               | 7.8E-3 ±<br>0.1E-3 <sup>b1,c1</sup> | < 0.01 |
| 375**        | 2.5E-2 ±<br>0.5E-1               | 0.1E-3 ±<br>0.2E-3               | 0.3E-5 ±<br>0.2E-5                  | 0.4                              | 3.9E-5 ±<br>0.8E-6     | 0.6E-5 ±<br>0.4E-6 <sup>a1</sup> | 0.5E-6 ±<br>0.3E-7 <sup>b1,c1</sup> | < 0.01 |
| 385**        | 1.52 ± 0.1                       | 5.6E-1 ±<br>0.7 <sup>a2</sup>    | 8.3E-2 ±<br>0.2 <sup>b1</sup>       | < 0.01                           | 2.3E-2 ±<br>0.5E-2     | 4.9E-4 ±<br>0.8E-5 <sup>a1</sup> | 2.8E-5 ±<br>0.1E-5 <sup>b1</sup>    | < 0.01 |
| ATCC 10231** | 2.8E-2 ±<br>0.2E-1               | 1.2E-3 ±<br>0.2E-2 <sup>a1</sup> | 2.1E-4 ±<br>0.6E-3 <sup>b1</sup>    | < 0.01                           | 1.5E-4 ±<br>0.3E-4     | 0.3E-5 ±<br>0.1E-6 <sup>a1</sup> | 3.4E-7 ±<br>0.4E-7 <sup>b1</sup>    | < 0.01 |
| 404*         | 1.9E-3 ±<br>0.5E-4               | 2.6E-2 ±<br>0.3E-2 <sup>a1</sup> | 5.4E-2 ±<br>0.4E-2 <sup>b1,c1</sup> | < 0.01                           | 1.4E-2 ±<br>0.4E-2     | 1.1 ± 0.5E-<br>1 <sup>a1</sup>   | 1.7 ±<br>0.5E-1 <sup>b1,c1</sup>    | < 0.01 |
| 777*         | 1.5E-3 ±<br>0.4E-3               | 1.3E-2 ±<br>0.5E-2 <sup>a1</sup> | 1.7E-2 ±<br>0.2E-2 <sup>b1</sup>    | < 0.01                           | 4.7E-5 ±<br>0.2E-5     | 3.3E-3 ±<br>0.5E-3               | 3.5E-2 ±<br>0.4E-2 <sup>b1,c1</sup> | < 0.01 |
| 718**        | 1.5E-1 ±<br>0.4E-1               | 5.4E-2 ±<br>0.4E-2 <sup>a1</sup> | 2.5E-2 ±<br>0.4E-2 <sup>b1</sup>    | < 0.01                           | 5.3E-3 ±<br>0.5E-3     | 0.7E-3 ±<br>0.2E-4 <sup>a1</sup> | 0.6E-3 ±<br>0.3E-4 <sup>b1</sup>    | < 0.01 |
| 752**        | 6.4E-2 ±<br>0.4E-2               | 5.9E-3 ±<br>0.1E-3 <sup>a1</sup> | 1.5E-3 ±<br>0.4E-3 <sup>b1</sup>    | < 0.01                           | 2.9E-1 ±<br>0.1E-1     | 0.3E-3 ±<br>0.5E-4 <sup>a1</sup> | 0.1E-3 ±<br>0.5E-6 <sup>b1</sup>    | < 0.01 |
| ATCC 22019** | 4.4E-1 ±<br>0.4E-1               | 6.5E-2 ±<br>0.4E-2 <sup>a1</sup> | 1.4E-2 ±<br>0.4E-2 <sup>b1,c2</sup> | < 0.01                           | 1.9E-2 ±<br>0.4E-3     | 6.4E-3 ±<br>0.4E-3 <sup>a1</sup> | 4.5E-3 ±<br>0.3E-3 <sup>b1,c1</sup> | < 0.01 |

\*Zayıf biyofilim yapan izolat.

\*\*Kuvvetli biyofilim yapan izolat.

<sup>a1</sup>F'süz-Mik-0.<sup>b1</sup>F'süz-Mik-2.<sup>c1</sup>Mik-0-Mik-2.

1α &lt; 0.01.

2α &lt; 0.05.

Farnesol, *Candida* tarafından üretilen hücre dışı bir QS molekülü olup birçok biyolojik etkisi bulunmaktadır<sup>12</sup>. Farnesol, mayaların planktonik popülasyonlarında mayadan hif formuna geçişi engeller. Hücre yoğunluğunu ve morfolojisini düzenleyerek biyofilm gelişiminin kontrolüne katkıda bulunur. Programlanmış hücre ölümünün başlatılmasında rol oynar<sup>26,27</sup>. Farnesolün *Candida* türleri üzerindeki antifungal ve antibiyofilm aktivitelerini taramalı elektron mikroskopu kullanarak inceleyen bir çalışmada; farnesolün hücre duvarında ve membranında hasara yol açtığı, vakuolizasyon veya granülasyona neden olduğu gösterilmiştir<sup>4</sup>.

Bu çalışmada, farnesolün planktonik *C.albicans* ve *C.parapsilosis* kompleks izolatları üzerine antifungal etkisi ile, farnesolün MİK-0 ve MİK-2 konsantrasyonlarında biyofilm biyokütlesinde oluşturduğu değişiklikler araştırılmıştır. Çalışmanın antifungal duyarlılık test sonuçlarına göre farnesolün test edilen izolatlar karşı geniş spektrumlu bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Farnesolün *C.albicans* ve *C.parapsilosis* kompleks izolatlarına karşı fungistatik etkisi en fazla, sırasıyla 1-2 mM ve 0.5-1 mM konsantrasyon aralıklarında görülmüştür. Ayrıca farnesol test edilen *Candida* izolatlarına karşı 1-4 mM konsantrasyon aralıklarında fungisidal bir etki sergilemiştir.

Farnesolün planktonik *Candida* türleri üzerindeki etkilerini araştıran birçok çalışma bulunmaktadır<sup>4,28,29</sup>. Yapıcı ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada<sup>4</sup>, farnesolün *Candida* türlerine etkisi farklı konsantrasyon aralıklarında test edilmiştir. Bu çalışmada farnesolün 37.5-600 µM konsantrasyon aralığında maya üremesini inhibe ettiği ve inhibisyon yüzdelерinin çalışılan izolatlar ve farnesol konsantrasyonuna bağlı olarak farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca Sachivkina ve arkadaşları farnesolün planktonik *C.albicans* ve non-*albicans* *Candida* izolatları üzerine etkisini araştırdıkları bir çalışmada<sup>29</sup>, tüm *Candida* izolatlarının farnesolün 0.8-400 µM arasındaki konsantrasyonlarına duyarlı olduklarını bulmuştur. Yılmaz Öztürk ve arkadaşları<sup>28</sup> farnesolün *C.albicans* ATCC 14053 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 üzerine antimikrobiyal etkisini BMD yöntemiyle belirlemişlerdir. Buna göre, farnesolün MİK değerlerini sırasıyla 8.33 µg/mL ve 16.65 µg/mL olarak tespit etmişlerdir. Çalışmada, *C.albicans*'ın farnesole *E.coli*'den daha duyarlı olduğu bulunmuştur.

Farnesolün *Candida* biyofilm oluşumuna etkisiyle ilgili mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış olsa da hücreler arası iletişimi etkileyebileceği ve bu yolla biyofilm oluşumunu baskılayabileceği düşünülmektedir<sup>12</sup>. Ayrıca farnesolün *Candida* hücre zarı bütünlüğünü bozarak ve sinyal yollarını etkileyerek biyofilm oluşumunu etkileyebileceği öne sürülmektedir<sup>12,26</sup>.

Bu çalışmada kuvvetli biyofilm oluşturan toplam 32 (%86.5) *Candida* izolatında farnesolün MİK-0 ve MİK-2 konsantrasyonlarında biyofilm biyokütlesinin azaldığı, zayıf biyofilm oluşturan 45 (%59.2) izolatla ise biyofilm biyokütlesinin arttığı bulunmuştur. Bu durumun hangi mekanizma ile geliştiği tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada kullanılan biyofilm biyokütle artışı veya azalışını tespit eden kristal viyole yönteminin yanı sıra,

biyofilm içeriğindeki canlı hücre sayısını belirleyen veya metabolik aktiviteyi ölçen farklı yöntemler (MTT, XTT gibi) kullanılarak deneylerin tekrar edilmesi biyofilmi oluşturan maya hücrelerinin ne kadarının canlı olduğunu belirlemek adına faydalı olacaktır. Rama-ge ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada<sup>12</sup> farnesolün farklı konsantrasyonlarının *C.albicans* biyofilm oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan farnesolün en yüksek konsantrasyonu olan 300 µM konsantrasyonda biyofilm oluşumunun inhibe olduğu bildirilmiştir. Benzer bir çalışmada Sachivkina ve arkadaşları<sup>29</sup> farnesolün farklı *Candida* suşlarına karşı inhibitör etkilerini incelemiş ve farnesolün düşük konsantrasyonlarına (0.2-6.3 µM) kıyasla yüksek konsantrasyonlarının (12.5-200 µM) biyofilm oluşumu üzerine inhibitör etkili olduğunu bulmuştur. Yapıcı ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada<sup>4</sup> farnesolün *Candida* biyofilm oluşumu üzerine etkisi konsantrasyon, maruziyet süresi ve tür bağımlı olarak incelenmiştir. Bu çalışmada farnesolün yüksek konsantrasyonlarının (37.5-600 µM) antibiyofilm aktivitesi gösterdiği, daha düşük konsantrasyonlarının (1.17-18.75 µM) biyofilm oluşumunu arttırdığı bulunmuştur. Araştırmacılar farnesolün, düşük konsantrasyonlarda hücreleri stresten koruyabildiğini ileri sürmüşler, ancak verilerin detaylı çalışmaları ile doğrulanması gerektiğini vurgulamışlardır. Rossignol ve arkadaşları<sup>30</sup> farnesolün *C.parapsilosis* CLIB214 suşunun biyofilm oluşumu üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu suş için 100 µM farnesol varlığında biyofilm oluşumunun %30'a kadar azaldığını, ancak farnesolün daha düşük konsantrasyonlarında antibiyofilm aktivitesinin olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmadaki farnesolün antibiyofilm aktivite sonuçlarının yukarıda bahsedilen çalışmaların sonuçları ile benzer olduğu görülmektedir. Ayrıca bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak *Candida* izolatlarının biyofilm oluşturma yetenekleri (kuvvetli, zayıf, negatif) de araştırılmıştır.

Farnesolün, *C.albicans*'ta filamentasyon sürecini ve biyofilm oluşumunu inhibe edici etkilere sahip olduğu bilinmektedir<sup>12</sup>. Farnesol, *EFG1* gen ifadesini baskılayarak filamentasyon oluşumunu engelleyebilir<sup>31</sup>. Ayrıca farnesol, biyofilm oluşumunda yer alan bazı genlerin (*TUP1*, *CRK1*, *PDE2* gibi) ifadesini de azaltabilir<sup>32</sup>.

*EFG1*, *Candida*'larda hif oluşumunun ana transkripsiyon düzenleyicileridir. *BCR1* ise hücre duvarı ve adezin genlerinin ifadesini etkileyerek hif hücrelerinin adezyon özelliklerini düzenleyen transkripsiyonel bir faktördür. Bu genlerin ifadelerinin azalışı, hif oluşumunun azalmasına ve dolayısıyla biyofilm oluşumunda inhibisyona neden olabilir<sup>31,32</sup>.

Bu çalışmada biyofilm ile ilişkili genlerin (*EFG1* ve *BCR1*) ifadelerindeki değişiklikler qRT-PCR ile incelenmiştir. Farnesolün MİK-0 ve MİK-2 konsantrasyonlarında zayıf biyofilm oluşturan izolatların *EFG1* ve *BCR1* gen ifadelerinin arttığı, bunun aksine kuvvetli biyofilm oluşturan izolatların bu konsantrasyonlarda gen ifadelerinin azaldığı görülmüştür ( $p < 0.01$ ). Literatürde az sayıda benzer çalışma bulunmakta ve genelde çalışmalar *C.albicans* üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu çalışmada farklı olarak farnesolün hem *C.albicans*, hem de *C.parapsilosis* kompleks türleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Davis-Hanna ve arkadaşları<sup>33</sup>, farnesolün *Ras1-Cdc35-Efg1* sinyal yolağının yanı sıra *HWP1*'in ifadesinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Nikoomanesh ve arkadaşları<sup>34</sup>, farnesolün

*C.albicans*'ın hif oluşumuna katkısı olan genlerin ifadeleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışmada 300 µM konsantrasyondaki farnesolün *C.albicans* maya hücrelerinin üremesini ve çoğalmasını inhibe ettiğini, ayrıca biyofilm oluşumunun bir basamağı olan hif oluşumunda rol alan *HWP1* ve *SAP6* genlerinin ifadelerinde önemli ölçüde azalma olduğunu bulmuşlardır.

Bu çalışma, farnesolün planktonik *Candida* türleri üzerine antifungal etkili olabileceğini ve biyofilm oluşumunu inhibe edebileceğini göstermektedir. Ancak, *Candida* türlerine ve kullanılan konsantrasyona bağlı olarak farnesolün etkinliğinin değişebileceği unutulmamalıdır. Bu çalışma sonuçları, farnesolün *Candida* biyofilmleri üzerine potansiyel inhibe edici etkisi sayesinde yeni antifungal ajanların geliştirilmesine yardımcı olabileceğini ve *Candida* enfeksiyonlarının tedavisi için yeni yaklaşımların geliştirilebileceğini düşündürmektedir.

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 13.04.2022 ve Araştırma Protokol No: 2020.90.04.14).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Demirbilek M, Timurkaynak F, Can F, Azap Ö, Arslan H. Hastane kaynaklı *Candida* türlerinde biyofilm oluşumu ve antifungal duyarlılık paternleri. Mikrobiyol Bul 2007; 41(2): 261-9.
2. Pereira R, Dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Moraes SM. Biofilm of *Candida albicans*: Formation, regulation and resistance. J Appl Microbiol 2021; 131(1): 11-22. <https://doi.org/10.1111/jam.14949>
3. Pristov K, Ghannoum M. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. Clin Microbiol Infect 2019; 25(7): 792-8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.028>
4. Yapıcı M, Gürsu BY, Dağ İ. In vitro antibiofilm efficacy of farnesol against *Candida* species. Int Microbiol 2021; 24(2): 251-62. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00162-4>
5. Yamin DH, Husin A, Harun A. Risk factors of *Candida parapsilosis* catheter-related bloodstream infection. Front Public Health 2021; 9: 631865. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.631865>
6. Al Thaqafi AH, Farahat FM, Al Harbi MI, Al Amri AF, Perfect JR. Predictors and outcomes of *Candida* bloodstream infection: Eight-year surveillance, Western Saudi Arabia. Int J Infect Dis 2014; 21: 5-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.12.012>
7. Pannanusorn S, Ramírez-Zavala B, Lünsdorf H, Agerberth B, Morschhäuser J, Römling U. Characterization of biofilm formation and the role of BCR1 in clinical isolates of *Candida parapsilosis*. Eukaryot Cell 2014; 13(4): 438-51. <https://doi.org/10.1128/EC.00181-13>
8. Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, Smith FJ, Yue F, Phan QT, et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. PLoS Pathog 2006; 2(7): 63. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020063>
9. Dižová S, Černáková L, Bujdáková H. The impact of farnesol in combination with fluconazole on *Candida albicans* biofilm: Regulation of *ERG20*, *ERG9*, and *ERG11* genes. Folia Microbiol 2018; 63(3): 363-71. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0574-z>
10. Polke M, Jacobsen ID. Quorum sensing by farnesol revisited. Curr Genet 2017; 63(5): 791-7. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0683-x>

11. Sebaa S, BoucheritOtmami Z, Courtois P. Effects of tyrosol and farnesol on *Candida albicans* biofilm. Mol Med Rep 2019; 19(4): 3201-9. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9981>
12. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. Appl Environ Microbiol 2002; 68(11): 5459-63. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5459-5463.2002>
13. Sachivkina N, Lenchenko E, Blumenkrants D, Ibragimova A, Bazarkina O. Effects of farnesol and lyticase on the formation of *Candida albicans* biofilm. Vet World 2020; 13(6): 1030-6. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1030-1036>
14. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard. CLSI document M27-A3. 3<sup>rd</sup> ed. Wayne: PAClinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
15. Rangel ML, de Aquino SG, de Lima JM, Castellano LR, de Castro RD. In vitro effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil on *Candida* spp. involved in oral infections. Evid Based Complement Alternat Med 2018; 4045013. <https://doi.org/10.1155/2018/4045013>
16. Melo AS, Bizerra FC, Freymuller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. Med Mycol 2011; 49: 253-62. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.530032>
17. Jin Y, Yip HK, Samaranyake YH, Yau JY, Samaranyake LP. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. J Clin Microbiol 2003; 41(7): 2961-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.2961-2967.2003>
18. Pumeesat P, Muangkaew, W, Ampawong, S, Luplertlop, N. *Candida albicans* biofilm development under increased temperature. New Microbiol 2017; 40(4): 279-83.
19. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods 2000; 40(2): 175-9. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
20. Aydin M, Öztürk A, Duran T, Özdemir Özmen Ü, Sumlu E, Bilen Ayan E, et al. In vitro antifungal and antibiofilm activities of novel sulfonyl hydrazone derivatives against *Candida* spp. J Mycol Med 2023; 33(1): 101327. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2022.101327>
21. Modiri M, Hashemi SJ, Ghazvinli RD, Khodavaisy S, Ahmadi A, Ghaffari M, et al. Antifungal susceptibility pattern and biofilm-related genes expression in planktonic and biofilm cells of *Candida parapsilosis* species complex. Curr Med Mycol 2019; 5(4): 35-42. <https://doi.org/10.18502/cmm.5.4.1950>
22. Alonso GC, Pavarina AC, Sousa TV, Klein MI. A quest to find good primers for gene expression analysis of *Candida albicans* from clinical samples. J Microbiol Methods 2018; 147: 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.02.010>
23. Sherry L, Rajendran R, Lappin DF, Borghi E, Perdoni F, Falleni M, et al. Biofilms formed by *Candida albicans* bloodstream isolates display phenotypic and transcriptional heterogeneity that are associated with resistance and pathogenicity. BMC Microbiol 2014; 14: 182. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-182>
24. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) method. Methods 2001; 25(4): 402-8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
25. Noble CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. Annu Rev Microbiol 2015; 69: 71-92. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>
26. Dižová S, Bujdákóvá H. Properties and role of the quorum sensing molecule farnesol in relation to the yeast *Candida albicans*. Pharmazie 2017; 72(6): 307-12.
27. Hogan DA. Talking to themselves: Autoregulation and quorum sensing in fungi. Eukaryot Cell 2006; 5(4): 613-9. <https://doi.org/10.1128/EC.5.4.613-619.2006>
28. Yılmaz Öztürk B, Gürsu YB, Dağ İ. In vitro effect of farnesol on planktonic cells and dual biofilm formed by *Candida albicans* and *Escherichia coli*. Biofouling 2022; 38(4): 355-66. <https://doi.org/10.1080/08927014.2022.2066530>
29. Sachivkina N, Podoprigora I, Bokov D. Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol. Vet World 2021; 14(6): 1608-14. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1608-1614>

30. Rossignol T, Logue EM, Reynolds K, Grenon M, Lowndes NF, Butler G. Transcriptional response of *Candida parapsilosis* following exposure to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(7): 2304-12. <https://doi.org/10.1128/AAC.01438-06>
31. Langford LM, Hargarten CJ, Patefield DK, Marta E, Blankenship JR, Fanning S, et al. *Candida albicans* Czf1 and Efg1 coordinate the response to farnesol during quorum sensing, white-opaque thermal dimorphism, and cell death. *Eukaryot Cell* 2013; 12(9): 1281-92. <https://doi.org/10.1128/EC.00311-12>
32. Yan Y, Tan F, Miao H, Wang H, Cao Y. Effect of shikonin against *Candida albicans* biofilms. *Front Microbiol* 2019; 10: 1085. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01085>
33. Davis-Hanna A, Piispanen EA, Stateva LI, Hogan DA. Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis. *Mol Microbiol* 2008; 67(1): 47-62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06013.x>
34. Nikoomanesh F, Falahatinejad M, Černáková L, Dos Santos ALS, Mohammadi SR, Rafiee M, et al. Combination of farnesol with common antifungal drugs: Inhibitory effect against *Candida* species isolated from women with RVVC. *Medicina* 2023; 59(4): 743. <https://doi.org/10.3390/medicina59040743>