



## Investigation of the antimicrobial effects of carvacrol in clinical *Candida* isolates and imaging by immunoelectron microscopic method

Bükay YENİCE GÜRSU \*<sup>1</sup>  
ORCID: 0000-0002-6822-3484

<sup>1</sup> Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (ARUM),  
26480 Eskişehir, Türkiye

### Abstract

*Candida* species can cause superficial and systemic disease and their biofilms have become an important problem for both hospital-acquired and device-associated infections. The efficacy of many antifungal agents are limited by their cytotoxicity and increasing rate of drug-resistant. In last years, the antimicrobial and antibiofilm activity of some natural products such as essential oils have drawn attention. Carvacrol [2-methyl-5-(1-methylethyl) phenol] is one of the phenolic components of thyme and have strong antimicrobial activity. Thus far, limited reports have discussed the antimicrobial effects of carvacrol on clinical *Candida* strains. In our study, it was aimed to investigate the effects of carvacrol on clinical *Candida* isolates by microbiological and transmission electronmicroscopic methods and to investigate the effects of carvacrol on the fungal cell wall by immunoelectron microscopic method using the hyphal wall protein Hwp1 protein. In this study, 24 clinical isolates and 1 reference strain (*C. albicans* ATCC 14053) were used. The minimum inhibitory concentration (MIC) of carvacrol was determined using the broth microdilution method. MIC results showed a MIC  $\leq$  0.031% (vol/vol) for all isolates tested. For transmission electron microscopic studies, isolates were also exposed to the carvacrol at concentration of 1/2 MIC for 48 hours and results were compared with the control. According to our results, carvacrol showed high antifungal potential with very low MIC values on *Candida* isolates. Electron microscopically, no growth was observed at the MIC value and the higher concentrations; cellular damage was also determined at sub MIC concentrations. It has been shown that carvacrol causes irreversible damage to cells. We observed that carvacrol did not increase cell growth or hyphal growth at all studied concentrations. The immunogold labeling results were used to observe the effect of carvacrol on the cell wall. Although immune labeling was greatly reduced in carvacrol treated cells, the presence of Hwp1 protein was also observed in the scattered cytoplasm. Usage of carvacrol in the topical treatment of *Candida* infections with further study it was determined that a potentially promising drug and detailed studies on the subject are needed.

**Key words:** *Candida*, biofilm, carvacrol

----- \* -----

### Klinik *Candida* izolatlarında karvakrolün antimikrobiyal etkilerinin araştırılması ve immunoelektron mikroskopik yöntem ile görüntülenmesi

### Özet

*Candida* türleri yüzeysel ve sistemik hastalığa sebep olurlar. *Candida* biyofilmleri de hastane kaynaklı ve vücut içi araçlarla ilişkili enfeksiyonlar için önemli bir sorundur. Birçok antifungal ajanın etkinliği, sitotoksitesi ve ilaca karşı artan direnç oranı nedeniyle sınırlıdır. Son yıllarda uçucu yağlar gibi bazı doğal ürünlerin antimikrobiyal ve antibiofilm etkinliği dikkat çekicidir. Karvakrol [2-metil-5-(1-metiletil) fenol], kekikteki fenolik bileşenlerden biridir ve güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Şu ana kadar, klinik *Candida* suşlarında karvakrolün antimikrobiyal etkilerini tartışan sınırlı sayıda çalışma vardır. Çalışmamızda, karvakrolün klinik *Candida* izolatları üzerindeki etkilerini mikrobiyolojik ve geçirimli elektron mikroskobu yöntemleri ile araştırmak ve karvakrolün fungal hücre duvarı

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +90222239 3750; Fax.: +90222 239 41 06; E-mail: bgursu@ogu.edu.tr

© Copyright 2022 by Biological Diversity and Conservation

Geliş tarihi: 08.05.2022; Yayın tarihi: 15.08.2022

BioDiCon. 1044-080522

üzerindeki etkilerinin hifal duvar proteini olan Hwp1 proteini kullanılarak immünoelektron mikroskopik yöntemle araştırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmada, 24 klinik izolat ve 1 referans (*C. albicans* ATCC 14053) kullanılmıştır. Karvakrolün minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK), broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. MİK sonuçları, test edilen tüm izolatlar için MİK  $\leq$  %0.031 (hacim/hacim) göstermiştir. Geçirimli elektron mikroskobu çalışmaları için izolatlar  $\frac{1}{2}$  MİK konsantrasyonunda 48 saat boyunca karvakrole maruz bırakılmış ve sonuçlar kontrol ile karşılaştırılmıştır. Bulgularımıza göre, karvakrol, *Candida* izolatlarında çok düşük MİK değerleri ile yüksek antifungal potansiyel göstermiştir. Elektron mikroskopik olarak, MİK değerinde ve yüksek konsantrasyonlarda herhangi bir büyüme gözlenmemiştir; Hüresel hasar, alt MİK konsantrasyonlarında da belirlenmiştir. Karvakrolün hücelere geri dönüşsüz bir hasar verdiği gösterilmiştir. Bulgularımıza göre, karvakrolün çalışılan tüm konsantrasyonlarda hücre büyümesini ya da hifal büyümeyi artırıcı etkisi olmadığını gözlemlenmiştir. İmmünogold etiketleme sonuçları, karvakrolün hücre duvarındaki etkisini gözlemlmek için kullanılmış; Karvakrol uygulanan hücrelerde immun etiketleme çok azalmış olmasına rağmen dağılmış stoplazma içerisinde de yer yer Hwp1 proteinin varlığı gözlemlenmiştir. Gelecekteki çalışmalar için *Candida* infeksiyonlarının topikal tedavisinde karvakrolün umut verici bir ilaç potansiyeli bulunmakta ve konu ile ilgili detaylı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** *Candida*, biyofilm, karvakrol

## 1. Giriş

*Candida* türleri fırsatçı fungal patojenler olup, bağışıklığı baskılanmış bireylerde yüksek bir morbidite ve mortaliteye yol açarlar [1]. Dünyada fungal kaynaklı ölümlere en çok neden olan cinsler arasında en üst sıralarda yer almaktadırlar. Oluşturdukları infeksiyonlar yüzeysel ya da hayatı tehdit eden yayılcı biçimlerde olabilmektedir [2]. Özellikle *C. albicans*, infeksiyonlardan en çok sorumlu olan tür olarak bilinmekle beraber, son yıllarda *C. albicans* dışı *Candida* infeksiyonları da sıklıkla rapor edilmektedir [3]. Biyofilm oluşumu *Candida* kaynaklı infeksiyonların oluşumunda çok önemli bir virülans faktörüdür [4]. Mikroorganizmaların bir yüzeye yapışması ve ardından biyofilm oluşturması suretiyle antimikrobialer ve dezenfektanlar gibi çevresel stres koşullarına karşı çok güçlü bir direnç kazanılmaktadır. Fungal infeksiyonların tedavisinde kullanılan ilaçlar sınırlı birkaç gruba içermekte olup, bunlar arasında hücre duvarını hedef alan ekinokandin grubu ilaçlar, hücre zarındaki ergosteröl hedef alan poliyen grubu ilaçlar, ergosterol biyosentezi üzerine etki eden triazol grubu ilaçlar ve nükleik asit biyosentezi üzerine etki eden pirimidin analogları bulunmaktadır [5]. Klinik uygulamalarda en sık kullanılan antifungaller ise flukonazol ve vorikonazol gibi triazolollerdir. Ancak bu ajanların çok yaygın olarak kullanılması, beraberinde antifungal direnç gelişimi sorununu ortaya çıkarmıştır. Bu yüzden *Candida* infeksiyonlarının tedavisinde daha az yan etkili ve doğal alternatiflerin araştırılması büyük önem taşımaktadır.

Son yıllarda esansiyel yağlar gibi antibiyotik içermeyen çeşitli bileşenlerin çeşitli bakteri, maya ve küfler üzerine olumlu etkileri rapor edilmektedir [6], [7]. Bu yağlar bitkilerin çeşitli bölümlerinden elde edilir ve aromatik yapılıdır. Bilinen tüm esansiyel yağlar içinde, karvakrolün çok güçlü antimikrobiyal etkileri olduğu da çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir [8], [9]. Karvakrol (2-methyl-5-(1-methylethyl) phenol) kekik otu ve kekik yağlarının ana bileşenlerinden biri olup fenolik yapıdadır [10]. Aynı zamanda güvenli gıda katkısı (GRAS) olarak da bilinir [11]. Bu amaçla çeşitli ürünlerde lezzet artırıcı ya da antimikrobiyal amaçlarla kullanılmaktadır. Antifungal tedavide de standart ilaçlar yerine bu ajanların kullanımı daha çok tercih edilebileceğinden, antimikrobiyal etkinliklerinin de detaylı şekilde ortaya konulması gerekir. Bu sebeple çalışmamızda biyofilm pozitif olarak tanımlanan klinik ve standart *Candida* izolatları üzerine karvakrolün antifungal etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Candidaların konakçı savunma sistemleri tarafından yok edilmesini engelleyen virülans faktörlerinden olan adezinlerinlerden biri de Hwp1 proteindir. Hwp1 proteini *in vivo* biyofilm oluşumu için gerekli olan tanımlanmış ilk *C. albicans* hücre yüzey proteindir. Hwp1 proteinin N-terminal bölgesi, Hwp1'i konak hücre duvarı glukana kovalent olarak çapraz bağlayan memeli transglutaminazları için bir substrat görevi görür ve oral epitel hücrelerine sıkı bir şekilde yapışmak için gerekli olduğunu bilinmektedir [12]. Hücre büyümesi ve biyofilm üzerine etki edecek bir ajanın bu proteinin sentezine olan etkisi de oldukça önemli olacaktır. *In vitro* olarak immünogold etiketleme sayesinde elektron mikroskopik olarak sentezlenmiş olan bu proteinin varlığının, miktarının ve lokalizasyonunun belirlenmesi de çalışmamızın diğer bir amacıdır.

## 2. Materyal ve yöntem

### 2.1. İzolatlar ve kimyasalla

Bu çalışmada kullanılan klinik izolatlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Esansiyel yağ komponenti olan karvakrol ( $\geq$ 98% saflıkta), Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Almanya firmasından satın alınmıştır. İzolatlar %15 gliserol içeren Yeast

Pepton Dekstroz (YPD) sıvı besiyerinde stok olarak -86 °C'de stok olarak saklanmıştır. RPMI 1640 sıvı besiyerinde 37 °C' de kültüre alınmışlardır. Kontrol mikroorganizması olarak *C. albicans* ATCC 14053 kullanılmıştır [13].

## 2.2. Antifungal duyarlılık testleri

Karvakrol etken maddesinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerinin belirlenmesinde Klinik ve Laboratuvar Standartlar Enstitüsü (CLSI) Mikrodilüsyon (CLSI [M27-A3] referans yöntemi kullanılmıştır [14]. Karvakrol, %0.0015, %0.003, %0.006, %0.013, %0.025, %0.05, %0,1, %0,2, %0,4 ve %0,8 (hacim / hacim) konsantrasyonlarında RPMI 1640 besiyeri içerisinde hazırlanmış ve minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir. Değerlendirilen her bir izolat için minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) değerlerinin belirlenebilmesi için, temiz üreme gözlenmeyen MİK kuyucuklarından Yeast Pepton Dekstroz katı besiyerine 0.1 ml aktararak 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve sonrasında değerlendirmeler yapılmıştır. MFK, hücrelerin %99,9'unu öldüren en düşük ilaç konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Amfoterisin B, *C. albicans* ATCC 14053'e karşı standart ilaç olarak kullanılmıştır. Tüm deneyler üçer defa uygulanmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır.

## 2.3. Geçirimli elektron mikroskopik inceleme (TEM)

Çalışmamızda, karvakrolün planktonik hücrelerinde sebep olduğu morfolojik değişiklikleri değerlendirmek için TEM kullanılmıştır [15]. Bu amaçla, standart referans mikroorganizması olarak kullanılan *C. albicans* ATCC 14053, 10 mL hücre süspansiyonları, 2xMIC, MIC ve ½ MIC konsantrasyonda karvakrol maruz bırakılmış ve daha sonra 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Karvakrol içermeyen kontrol grubu da çalışmaya dahil edilmiştir. Hücre süspansiyonları steril plastik santrifüj tüpleri içerisinde 5000 g'de 15 dakika süreyle santrifüje tabi tutulup ve PBS (fosfat tamponlu salin tamponu) ile üç kez (10 dakika) ardışık olarak yıkanmıştır. Daha sonra süpernatant atılıp ve pelet haline getirilen hücresel içerik, gece boyunca 4°C'de PBS içerisinde hazırlanan %2,5 glutaraldehitte fikse edilmiştir. Numuneler daha sonra, oda sıcaklığında PBS tamponunda çözündürülüp %1 osmiyum tetrokside 2 saat fikse edilmiş ve PBS içinde yıkanmışlardır (Üç kez, her biri 15 dakika). Fikse olan hücreler %5 agar içine gömülmüş ve %1 uranil asetat ile blok boyama yapılmıştır. Daha sonra etanol içerisinde her biri 15 dakika süreyle %40, %60, %75, %80 ve %95 dilüsyon serileri ile dehidrasyona bırakılmıştır. Son dehidrasyon basamağı, %100 etanol içinde 1 saat boyunca ve her 30 dakikada bir değiştirilerek gerçekleştirilmiştir. Daha sonra örnekler epoksi resin içerisine gömülerek 48 saat boyunca 60°C'de polimerize edilmiştir. Numunelere ait blokların ultra ince kesitleri bir ultramikrotom (Leica Ultracut) yardımıyla 60 nm kalınlıkta alınmış, kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanmışlardır. Hücrelerin ultrayapısal morfolojisi JEOL JEM 1220 marka/model geçirimli elektron mikroskopunda gözlemlenmiştir.

## 2.4. İmmuno elektron mikroskopik inceleme

Gömülü numunelerin ultra ince kesitleri (60 nm), %1 periyodik asit sulu çözeltisi ile oda sıcaklığında 4 dakika süreyle ile ön işleme tabi tutulmuş, ardından poliklonal anti-hwp1 (MyBioSource) primer antikor (1/1000 konsantrasyonda) ile gece boyunca 4°C'de nem tuzağı içerisinde ve inkübasyon sonrası protein A-altın kompleksleri (1/100 Protein A Gold Conjugate 20nm abcam) ile oda sıcaklığında 2 saat süre ile immunogold işaretleme gerçekleştirilmiştir [16]. Hazırlanan örnekler Hitachi HT 7800 marka/model TEM ile analiz edilmiştir.

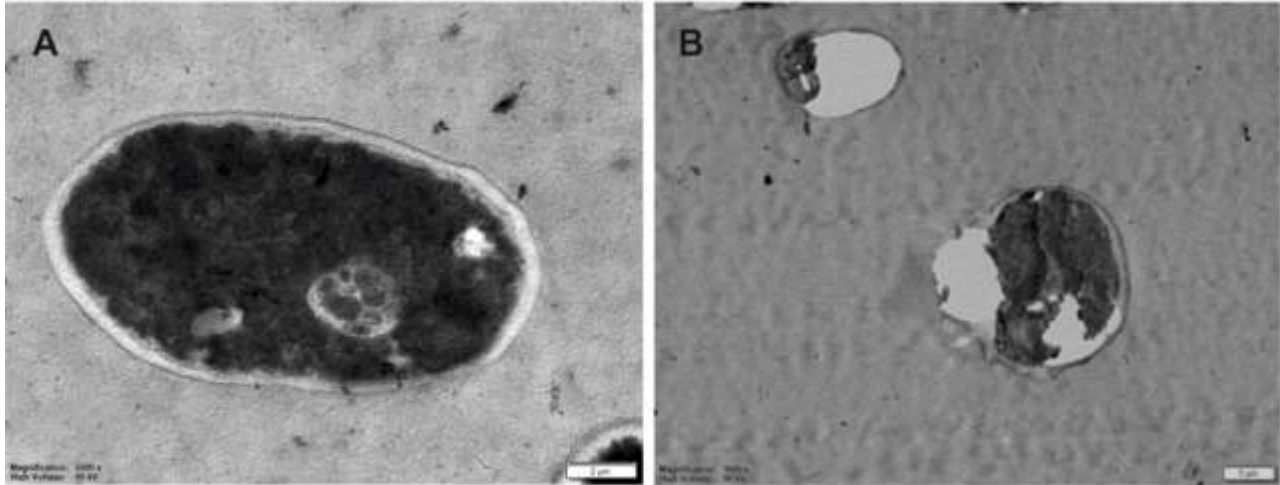
## 3. Bulgular

Çalışmamızda karvakrol için sıvı mikrodilüsyon testi ile elde edilen MİK değerleri çalışılan tüm izolatlarda MİK ≤ 0.031% (vol/vol) şeklinde elde edilmiş ve sonuçlar Tablo 1' de özetlenmiştir. Amfoterisin B için *C. albicans* ATCC 14053 ile elde edilen MİK değeri 0,08 olarak bulunmuştur. Standart antifungal olarak mantar hastalıklarının tedavisinde sıkça kullanılan Amfoterisin B çalışmamızda da kontrol ilacı olarak kullanılmıştır. Amfoterisin B ile elde edilen değerle karşılaştırıldığında, karvakrolün *Candida* izolatları üzerine yüksek bir antifungal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Standart suş ile klinik izolatların duyarlılıkları arasında önemli bir farklılık gözlenmemiş, bazı izolatlarda etki daha fazla olarak belirlenmiştir. Çalışılan izolat sayısı çok fazla olmamakla beraber, 6 farklı tür arasında antifungal duyarlılık bakımından önemli bir fark görülmemiş ve izolatlar suş-bağımlı bir etki sergilemişlerdir. En kuvvetli etki *C. parapsilosis* 1814 izolatında görülmüş ve MİK değeri 0.004 olarak tespit edilmiştir. MFK değerleri de genel olarak MİK değerlerine eşit olarak bulunmuştur.

Tablo1. Karvakrolün standart ve klinik *Candida* izolatlarına karşı sıvı mikrodilüsyon testi ile elde edilen MİK değerleri (vol/vol) olarak verilmiştir

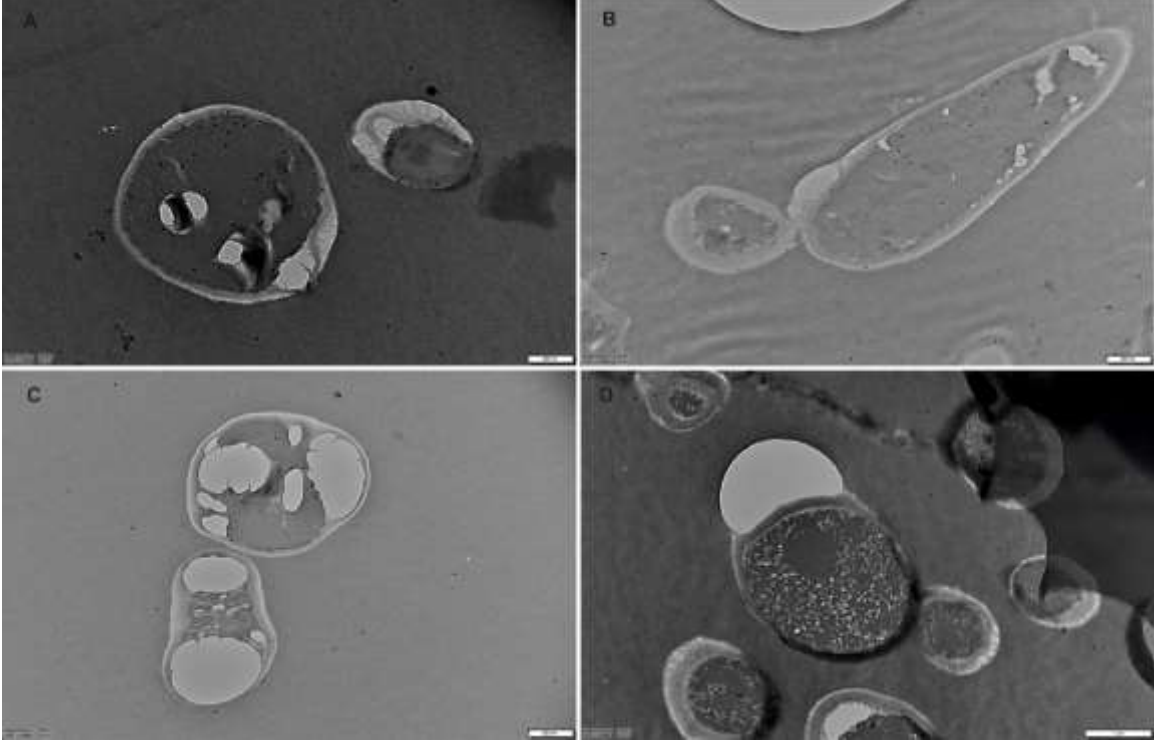
Fungal izolat	Karvakrol MİK (v/v)	Karvakrol MFC (v/v)	Fungal izolat	Karvakrol MİK (v/v)	Karvakrol MFC (v/v)
<i>C. kefyi</i> 1706	0.016	0.031	<i>C. krusei</i> 1670	0.016	0.016
<i>C. kefyi</i> 1620	0.016	0.031	<i>C. krusei</i> 1561	0.008	0.016
<i>C. kefyi</i> 1798	0.016	0.031	<i>C. krusei</i> 1675	0.016	0.031
<i>C. albicans</i> 1697	0.031	0.031	<i>C. krusei</i> 1677	0.031	0.031
<i>C. albicans</i> 1710	0.031	0.031	<i>C. tropicalis</i> 1678	0.016	0.016
<i>C. albicans</i> 1802	0.031	0.031	<i>C. tropicalis</i> 1660	0.016	0.016
<i>C. albicans</i> 1724	0.016	0.016	<i>C. tropicalis</i> 890	0.031	0.031
<i>C. albicans</i> 1766	0.031	0.031	<i>C. tropicalis</i> 1653	0.031	0.031
<i>C. glabrata</i> 1797	0.031	0.031	<i>C. parapsilosis</i> 893	0.031	0.031
<i>C. glabrata</i> 1744	0.031	0.031	<i>C. parapsilosis</i> 1814	0.004	0.016
<i>C. glabrata</i> 1701	0.031	0.031	<i>C. parapsilosis</i> 1799	0.016	0.016
<i>C. parapsilosis</i> 1806	0.031	0.031	<i>C. albicans</i> ATCC	0.031	0.031

Geçirimli elektron mikroskopik incelemelerde kontrol grubuna ait hücreler iyi korunumlu morfolojiye sahip hücre duvar ve membran yapısı göstermişlerdir (Şekil 1 A).



Şekil 1. Karvakrolün *C. albicans* ATCC 14053 ile muamesesi öncesi ve sonrasında elde edilen TEM görüntüleri A- Kontrol grubu hücresi B- Subinhibitör konsantrasyonda (1/2 MİK) uygulanan karvakrolün etkisi

Hücreler subinhibitör konsantrasyonda (1/2 MİK) ve 24 saat süre ile karvakrole maruz bırakıldıklarında ise tamamen parçalanmış ve geri dönüşümsüz bir hasara uğramışlardır. Bu hasar taranan tüm bölgelerde gözlenmiş ve *Candida*-sidal olarak tespit edilmiştir (Şekil 1 B).



Şekil 2. Anti hwp antijeni ve protein A sekonder antikor kullanılarak immunogold işaretlenmiş hücreler. A ve B Kontrol grubu; C ve D ise karvakrol ile muamele edilmiş *C. albicans* ATCC 14053 hücrelerini göstermektedir

İmmünogold etiketleme ile karvakrol uygulanmamış kontrol grubu hücrelerinde de periyodik asit uygulamasına bağlı olarak az miktarda hücre hasarı gerçekleşmiştir. Ancak altın partikülleri hücre duvarında daha fazla olmak üzere az miktarlarda sitoplazmada da gösterilmiştir (Şekil 2 A ve B). Karvakrol uygulanmış hücrelerde de immün etiketleme gerçekleşmiş ancak altın partiküllerin miktarı önemli derecede azalmıştır. Dağılmış sitoplazma içerisinde de yer yer Hwp1 proteininin varlığı gözlemlenmiştir. Spesifik olmayan etiketleme seviyesi, altın partiküllerinin ara sıra mevcudiyeti ile gösterildiği gibi genellikle düşüktür (Şekil 2 C ve D).

#### 4. Sonuçlar ve tartışma

Çeşitli *Candida* türleri tarafından oluşturulan yüzeysel ya da sistemik infeksiyonlar tüm dünyadaki fungal hastalıkların ilk sıralarında yer almaktadır [17]. İnsanlarda kommensal olarak bulunan *Candida*'lar bağışıklığın herhangi bir nedenle baskılandığı durumlarda kandidoz olarak tanımlanan fırsatçı infeksiyonlara yol açarlar [18], [19], [20]. Amfoterisin B ve flukonazol, kandidoz tedavisinde kullanılan en önemli ilaçlardır. Sistemik infeksiyonlarda ilk seçilen ilaç flukonazoldür ancak bu antifungalin uygunsuz ve aşırı kullanımları sonucu bu ilaca direnç gösteren *Candida* suşlarında büyük bir artış görülmektedir [21]. Amfoterisin B ve flukonazolün fungisidal etkileri arasındaki farklılıklar genel olarak etki mekanizmaları ile ilgilidir. Amfoterisin B, fungal hücre membranında porlar oluşturarak geçirgenliği değiştirir ve hücre ölümüne yol açar [22]. *Candida* ile mücadelede mükemmel bir antifungal olmakla birlikte, yüksek toksisiteye sahip olması kullanımını sınırlamaktadır [23]. Flukonazol ise fungal hücredeki plazma membranının temel komponenti olan ergosterol biyosentezini inhibe ederek etkisini gösterir. Ancak bu ilaca direnç görülme olasılığı da oldukça yüksektir [24]. Bu sebeple araştırmacılar yeni antifungal tedavi stratejileri üzerine yoğunlaşmaktadırlar.

Yapılan çalışmalarda esansiyel yağların kompozisyonları, coğrafik lokasyonları, iklim durumları, içerik ya da kaliteleri gibi faktörlere bağlı olarak antimikrobiyal etkinliklerinin de değişebildiği belirtilmektedir [25]. Bununla beraber esansiyel yağların da mikroorganizmalar üzerine etkileri farklı etki mekanizmalarına bağlı olmaktadır. Genel olarak esansiyel yağların antimikrobiyal etkinliklerinin mikroorganizmanın membran yapısı ve fonksiyonu üzerinden etki ettiği düşünülmektedir ancak bu konu tam olarak aydınlığa kavuşmuş da değildir [26]. Son yıllarda *Candida* türleri üzerine çeşitli esansiyel yağların etkilerini araştıran çeşitli araştırmalar bulunmaktadır. Ultee ve Smid'in yaptıkları bir çalışmada kekik otu ve dağ kekiği esansiyel yağlarının fungal patojenler için en iyi inhibitörlerden biri olabileceği rapor edilmiştir. Araştırmacılar bu bitkilerin fenolik komponentleri olan karvakrol ve timolün fungal hücre membranını tahrip ettiğini belirtmişlerdir [27]. Vardar-Ünlü vd. (2010) ve arkadaşları, 100 klinik *C. albicans* izolatı üzerinde yaptıkları bir araştırmada karvakrolün antifungal etkinliğini belirleyebilmek için brot mikrodilüsyon testini kullanmışlardır.

Karvakrol, çalışılan tüm izolatlar üzerine %0.125-%0.004 arasında değişen MİK değerleri ile güçlü bir antifungal aktivite göstermiştir. Test edilen izolatların MİK ve MFK değerleri birbirine benzer olarak bulunmuştur [28]. Bizim çalışmamızda da karvakrolün izolatlar üzerine gösterdiği MİK değerleri %0.005-%0.031 arasında değişiklik göstermiştir ve MİK değerleri ile MFK değerleri benzerlik göstermiştir. Manohar ve arkadaşları, kekik yağının 0.25 mg/ml'de kültürdeki *C. albicans* gelişimini tamamen inhibe ettiğini göstermişlerdir. 0.125 mg/ml'de %75 gelişim inhibisyonu ve 0.0625 mg/ml'de >50% oranında bir gelişim inhibisyonu tespit etmişlerdir [29]. Araştırmacılar ayrıca origanum yağı ve karvakrolün, *C. albicans*'daki çimlenme ve miselyal gelişimini doz bağımlı olarak inhibe ettiğini göstermişlerdir. Chami ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, immünbaskılanmış ratlarda *C. albicans* ile indüklenerek oral kandidoz oluşturulmuş ve tedavide karvakrol ve eugenolün terapötik etkinlikleri değerlendirilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak nistatin kullanılmıştır. Araştırmacılar hem karvakrol hemde eugenolün güçlü antifungal etkilerini ortaya koyarak oral kandidoz için terapötik olarak kullanımını önermişlerdir [30]. Lima ve arkadaşları, *C. albicans* izolatları üzerine karvakrolün antifungal aktivitesi ve etki mekanizmasını araştırdıkları çalışmalarında bitki bileşenlerinin fungal hücre duvarını modifiye ederek değil, hücre membranındaki sterollere bağlanarak etki gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Ancak bu etki mekanizmasının tanımlanması için detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunduğunu belirtmişlerdir [31]. Benzer şekilde Rao ve arkadaşları, karvakrolün hücredeki kalsiyum homeostasisini bozarak antifungal aktivite sergilediğini açıklamışlardır [32]. Ahmad ve arkadaşları karvakrolün ergosterol biyosentezini tahrip ederek etki ettiğini [33]; Chami ve arkadaşları (2005) ise plazma membranını bozarak etki ettiğini açıklamışlardır. Hala tam olarak açıklanamayan bu etki mekanizması hakkında Chaillot ve arkadaşları da karvakrolün *C. albicans*'da ER stresi oluşturarak etki ettiğini göstermişlerdir [30], [34]. Araştırmacılar ER'un mantarlarda ergosterol, lipid ve hücre duvar komponentlerinin sentezlenme yeri olduğunu belirterek, ER daki stresin membrandaki ergosterol ya da diğer lipidlerin içeriğini bozarak etki ettiğini ifade etmişlerdir [33]. Bizim TEM deki gözlemlerimize göre de karvakrolün *Candida* hücreleri üzerine çok güçlü bir etkisi vardır ve bu etki sadece tek hedefli değil belki de çok hedefli olabilmektedir. Şekil 1 B' de hücrelerde membran parçalanmış neredeyse sitoplazma kaybolmuş ve içeriği dağılmış durumdadır.

Bu çalışmada karvakrolün etkisini hücre büyümesi sırasında sentezlenen ve biyofilm oluşumunda da etkin rol oynayan hücre duvar proteini Hwp1 üzerinden göstermek için elektron mikroskopik bir metot olarak immunogold etiketleme tekniğinden faydalanılmıştır. Literatürde *Candida* üzerine yapılan çalışmalarda birçok bileşiklerin hücre duvar proteini üzerine etkisi araştırılmıştır ancak karvakrol ile *Candida* hücrelerinde benzer bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır [35], [36]. Rutin olarak elektron mikroskopik incelemelerimizde kullandığımız glutaraldehit ve osmiyum tetroksit ile iki basamaklı fiksasyon ve ardından epona gömme işlemleri genellikle immüno-etiketlemeyi engellemektedir. Bununla birlikte, kesitlerin kuvvetli oksitleyici reaktiflerle ön işleme tabi tutulması, bu sorunun üstesinden gelme imkanı sunar ve rutin elektron mikroskopik takip işlemleriyle gömülmüş bloklardan geriye dönük çalışmalar için ideal bir araç sağlayabilmektedir. Oksitleyici ajanların, osmiyum tetroksit fiksasyonunun etkisini "ters çevirdiği" mekanizma belirsizdir [16]. Biz de bu çalışmamızda oksitleyici çözelti olan %1 periyodik asit sulu çözeltisi ile oda sıcaklığında 4 dakika süreyle muamele ettiğimiz kesitlerimizde etiketlemenin başarılı olduğunu tespit ettik. Ancak asit muamelesi kontrol grubu hücrelerinde de bir miktar hasara sebep olmuştur (Şekil 2 A ve B). Meydana gelen hasarın periyodik asit muamelesinden kaynaklandığı, asit muamele edilmemiş kesitlerin sağlıklı hücre görüntüde olması ile anlaşılmıştır. Diğer yandan karvakrol uygulanan hücrelerdeki hasar, kontrol grubuna göre çok daha fazla bulunmuştur (Şekil 2 A ve B).

Sonuç olarak, çalışmamızdan elde edilen sonuçlar karvakrolün kandidoz tedavisi için ümit verici bir potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir. TEM ile yaptığımız çalışmalarda karvakrolün hücrelere geri dönüşümsüz bir hasar verdiği ve hem membran inhibisyon mekanizmasını hem de stoplazmayı ileri derecede etkileyebildiği tespit edilmiştir. Karvakrol belki de *Candida* infeksiyonlarının topikal tedavisinde umut verici bir ilaç olarak kullanılabilir. Ancak bu konuda daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Diğer yandan deney gruplarında gözlenen immunogold etiketleme miktarındaki azalma, karvakrolün hücre büyüme evrelerinde ya da hücre duvar proteinleri sentezinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Gelecek çalışmalarda etiketlenecek hedef protein çeşitliliği artırılarak karvakrolün etki mekanizmasının aydınlatılmasına ışık tutabilecek kıymetli veriler elde edilebilir.

## Kaynaklar

- [1] Silva, R. F. (2010). Fungal infections in immunocompromised patients. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 36, 142-147.
- [2] Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Giannini, M. M. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of medical microbiology*, 62(1), 10-24.
- [3] Kim, J., & Sudbery, P. (2011). *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *The journal of microbiology*, 49(2), 171-177.
- [4] Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128.

- [5] Marr, K. (2004). Combination antifungal therapy: where are we now, and where are we going?. *Oncology (Williston Park, NY)*, 18(13 Suppl 7), 24-29.
- [6] Goel, N., Rohilla, H., Singh, G., & Punia, P. (2016). Antifungal Activity of Cinnamon Oil and Olive Oil against *Candida* Spp. Isolated from Blood Stream Infections. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 10(8), DC09.
- [7] Öztürk, B. Y. (2019). Intracellular and extracellular green synthesis of silver nanoparticles using *Desmodesmus* sp.: their Antibacterial and antifungal effects. *Caryologia*, 72(1), 29-43.
- [8] Öztürk, B. Y., Gürsu, B. Y., & Dağ, İ. (2020). Antibiofilm and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles using marine red algae *Gelidium corneum*. *Process Biochemistry*, 89, 208-219.
- [9] Öztürk, B. Y., Öztürk, D. (2020). *Tilia rubra* DC. ekstraktı kullanılarak gümüş nanopartikülün hücre dışı biyosentezi ve antifungal aktivitesi. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 13(3), 244-251
- [10] Uchida, N. S., Grespan, R., Piovezan, M., Ferreira, E. C., Júnior, M. M., Cuman, R. K., & Mikcha, J. M. (2015). Effect of carvacrol on *Salmonella* Saintpaul biofilms on stainless steel surface. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14(6), 1075-1079.
- [11] Magi, G., Marini, E., & Facinelli, B. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A *Streptococci*. *Frontiers in microbiology*, 6, 165.
- [12] Nobile, C. J., Nett, J. E., Andes, D. R., & Mitchell, A. P. (2006). Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryotic cell*, 5(10), 1604-1610.
- [13] Tyagi, A. K., & Malik, A. (2010). In situ SEM, TEM and AFM studies of the antimicrobial activity of lemon grass oil in liquid and vapour phase against *Candida albicans*. *Micron*, 41(7), 797-805.
- [14] Clinical Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard-Third Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. *CLSI document M27-A3*.
- [15] Yapıcı, M., Gürsu, B. Y., & Dağ, İ. (2021). In vitro antibiofilm efficacy of farnesol against *Candida* species. *International Microbiology*, 24(2), 251-262.
- [16] Zuber, C., Fan, J., Guhl, B., & Roth, J. (2005). Applications of immunogold labeling in ultrastructural pathology. *Ultrastructural Pathology*, 29(3-4), 319-330.
- [17] Achkar, J. M., & Fries, B. C. (2010). *Candida* infections of the genitourinary tract. *Clinical microbiology reviews*, 23(2), 253-273.
- [18] Mavor, A. L., Thewes, S., & Hube, B. (2005). Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Current drug targets*, 6(8), 863-874.
- [19] Ferreira AV, Prado CG, Carvalho RR, Dias KS, Dias AL (2013) *Candida albicans* and Non- albicans *Candida* Species: comparison of biofilm production and metabolic activity in biofilms, and putative virulence properties of isolates from hospital environments and infections. *Mycopathologia* 175(3)265–272.
- [20] Gursu, B. Y., Dag, İ., & Dikmen, G. (2021). Antifungal and antibiofilm efficacy of cinnamaldehyde-loaded poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles against *Candida albicans*. *International Microbiology*, 1-14.
- [21] Khan, M. S. A., Malik, A., & Ahmad, I. (2012). Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 50(1), 33-42.
- [22] Mesa-Arango, A. C., Scorzoni, L., & Zaragoza, O. (2012). It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontiers in microbiology*, 3, 286.
- [23] Mora-Duarte, J., Betts, R., Rotstein, C., Colombo, A. L., Thompson-Moya, L., Smietana, J., & Perfect, J. (2002). Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *New England Journal of Medicine*, 347(25), 2020-2029.
- [24] Onyewu, C., Blankenship, J. R., Del Poeta, M., & Heitman, J. (2003). Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(3), 956-964.
- [25] Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2016.



- [26] Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.
- [27] Ultee, A., & Smid, E. J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International journal of food microbiology*, 64(3), 373-378.
- [28] Vardar-Ünlü, G., Yağmuroğlu, A., & Ünlü, M. (2010). Evaluation of in vitro activity of carvacrol against *Candida albicans* strains. *Natural product research*, 24(12), 1189-1193.
- [29] Manohar, V., Ingram, C., Gray, J., Talpur, N. A., Echard, B. W., Bagchi, D., & Preuss, H. G. (2001). Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Molecular and cellular biochemistry*, 228(1-2), 111-117.
- [30] Chami, N., Bennis, S., Chami, F., Aboussekhra, A., & Remmal, A. (2005). Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo. *Oral microbiology and immunology*, 20(2), 106-111.
- [31] Lima, I. O., Pereira, F. D. O., Oliveira, W. A. D., Lima, E. D. O., Menezes, E. A., Cunha, F. A., & Diniz, M. D. F. F. M. (2013). Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *Journal of essential oil research*, 25(2), 138-142.
- [32] Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., & Rao, R. (2010). Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(12), 5062-5069.
- [33] Ahmad, A., Khan, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L. A., & Manzoor, N. (2011). Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 30(1), 41-50.
- [34] Chaillot, J., Tebbji, F., Remmal, A., Boone, C., Brown, G. W., Bellaoui, M., & Sellam, A. (2015). The monoterpene carvacrol generates endoplasmic reticulum stress in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(8), 4584-4592.
- [35] Khodavandi, A., Harmal, N. S., Alizadeh, F., Scully, O. J., Sidik, S. M., Othman, F., & Chong, P. P. (2011). Comparison between allicin and fluconazole in *Candida albicans* biofilm inhibition and in suppression of HWP1 gene expression. *Phytomedicine*, 19(1), 56-63.
- [36] Staab, J. F., Bradway, S. D., Fidel, P. L., & Sundstrom, P. (1999). Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science*, 283(5407), 1535-1538.