

T. C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KANDİDOZLU SIÇAN MODELİNDE IFN- γ , TNF- α , IL-10 İFADELENMESİNİN TERS TRANSKRİPTAZ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) İLE GÖSTERİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emine YEŞİLYURT

Tez Danışmanı

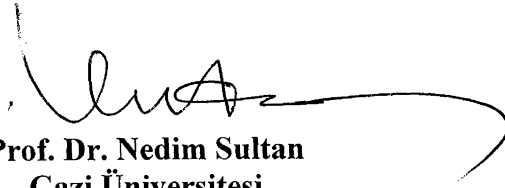
Yrd. Doç. Dr. Işıl FİDAN

ANKARA
Haziran 2007

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 26/06/2007



**Prof. Dr. Nedim Sultan
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**



**Prof. Dr. Deniz Erbaş
Gazi Üniversitesi**



**Yrd. Doç. Dr. Işıl Fidan
Gazi Üniversitesi**

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimine başlamamda büyük katkıları bulunan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Nedim Sultan'a; eğitimim boyunca, yaşamımın her alanında ve tez çalışmamda bana her zaman destek olan ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Işıl Fidan'a; tez çalışmamda büyük yardımları olan Sayın Doç. Dr. Ayşe Kalkancı'ya; her zaman yanımda olan arkadaşım Bio. Berna Erdal'a ve beni sabırla dinleyip desteğini esirgemeyen Dr. M. Cihat Oğan'a sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
II. a. Tarihçe	3
II. b. Taksonomi	3
II. c. Ekoloji	3
II. d. Mikrobiyolojik Özellikler	4
II. e. Hücre Yapısı	5
II. f. Virulans Faktörleri	6
II. f. 1. Yapışma (Aderans)	7
II. f. 2. Morfolojik Değişim	7
II. f. 3. Fenotipik Değişim	8
II. f. 4. Toksinler ve Enzimler	8
II. f. 5. Biyofilm Oluşumu	9
II. g. Candida İnfeksiyonları ve Patogenez	9
II. g. 1. İmmunopatogenez	10
II. g. 2. Sitokinler	11
II. g. 2. 1. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)	12
II. g. 2. 2. İnterferon Gama (IFN- γ)	13
II. g. 2. 3. İnterlökin 10 (IL-10)	14
II. h. Kandidozda Bağışıklık	15
II. i. Kandidozda Tanı	19
II. i. Polymerase Chain Reaction (PCR)	21

II. i. 1. Oligonükleotid Primerler	24
II. i. 2. DNA Polimeraz	25
II. i. 3. Deoksinükleozid Trifosfatlar (dNTPs)	25
II. i. 4. Tamponlar	26
II. i. 5. MgCl ₂	26
II. i. 6. Sıcaklık Döngüleri	27
II. i. 7. Hedef	27
II. j. RT-PCR	29
III. GEREÇ VE YÖNTEM	30
III. a. Gereçler	30
III. a. 1. Cihazlar	30
III. a. 2. Kimyasallar	31
III. a. 3. Diğerleri	32
III. b. Yöntemler	33
III. b. 1. Suşlar	33
III. b. 2. Hayvan Modeli	33
III. b. 3. Kandideminin Doğrulanması	34
III. b. 3. 1. Kültür	34
III. b. 3. 2. Candida PCR	34
III. b. 3. 2. a. DNA'nın Eldesi Yöntemi	34
III. b. 3. 2. b. DNA Varlığının Doğrulanması	35
III. b. 3. 2. c. Candida PCR	35
III. b. 3. 2. d. Fungal DNA'nın Dokuda Gösterilmesi	36
III. b. 3. 3. Kitin Ölçümü	36
III. b. 3. 4. Dokulardan mRNA Eldesi	37
III. b. 3. 5. Sitokin (IFN- γ , TNF- α , IL-10) PCR	38
III. b. 3. 5. a. RT-PCR	39
III. b. 4. Kontaminasyona Karşı Koruma	42
III. b. 5. İstatistiksel Analiz	43

IV. SONUÇLAR	44
IV. 1. Nötropenin Gösterilmesi	44
IV. 2. Kandidemin Doğrulanması	45
IV. 2. a. Kültür	45
IV. 2. b. DNA Varlığının Doğrulanması	47
IV. 2. c. Fungal DNA'nın Dokuda Gösterilmesi	48
IV. 2. ç. Kitin Ölçüm Sonuçları	49
IV. 3. Sitokinlerin İfadelemesinin RT-PCR Sonuçları	51
IV. 3. 1. TNF- α 'nın Gösterilmesi	51
IV. 3. 2. IFN- γ İfadesinin Gösterilmesi	52
IV. 3. 3. IL-10 İfadesinin Gösterilmesi	53
V. TARTIŞMA	55

KAYNAKÇA

ÖZGEÇMİŞ

TABLolar

Tablo 1: β -aktin Geni Primerleri	35
Tablo 2: Fungal DNA Gösteriminde Kullanılan Primerler	36
Tablo 3: Sitokin RT-PCR Çalışmasında Kullanılan Primerler	38
Tablo 4: PCR Reaksiyon Karışımı (1. Tur) (cDNA Eldesi İçin)	40
Tablo 5: PCR Reaksiyon Karışımı (2.Tur) (cDNA Çoğaltılması İçin)	41
Tablo 6: cDNA Çoğaltılması İçin Yapılan PCR Sıcaklık Döngüleri	42
Tablo 7: Kitin Ölçüm Sonuçları	50
Tablo 8: PCR ile Elde Edilen Sitokin İfadelemesi Sonuçlarının Karşılaştırılması	54

ŞEKİLLER

Şekil 1: <i>C. albicans</i> 'ın Hücre Duvar Yapısı ve Katmanları	6
Şekil 2: Bazı Sitokinlerin Özellikleri	13
Şekil 3: IFN- γ ve Görevleri	14
Şekil 4: Sitokin ve Hücre Etkileşimleri	17
Şekil 5: T Lenfositleri ve Sitokinleri	18
Şekil 6: PCR Yönteminin Aşamaları	22
Şekil 7: PCR Yöntemi İle Oluşan Ürünler	24
Şekil 8: Kandidemi Grubunun Periferik Yayma Preparatı	44
Şekil 9: SDA Agarda Üreyen <i>Candida</i> Hücreleri	45
Şekil 10: Böbrek Kandidozu Oluşturulmuş Deney Hayvanlarında Böbrekte İnfeksiyon Odakları	46
Şekil 11: Bazı Kontrol Grubu Örneklerinde β -aktin	47
Şekil 12: İnfekte Grupta β -aktin	47
Şekil 13: İnfekte Sıçanlara Ait Panfungal PCR Sonuçları	48
Şekil 14: Kontrol Grubu Sıçanlara Ait Dokuda Panfungal PCR Sonuçları	48
Şekil 15: Kontrol Grubu Örneklerinde TNF- α İfadelenmesi	51

Şekil 16: İnfekte Böbrek Dokularında TNF- α İfadenmesi	51
Şekil 17: Kontrol Grubu Örneklerinde IFN- γ İfadesini Gösteren Bantlar	52
Şekil 18: İnfekte Böbrek Dokularında IFN- γ İfadesini Gösteren Bantlar	52
Şekil 19: Kontrol Grubu Örneklerinde IL-10 İfadesini Gösteren Bantlar	53
Şekil 20: İnfekte Grup Örneklerinde IL-10 İfadesini Gösteren Bantlar	53

GRAFİK

Grafik 1: Kontrol ve İnfekte Grupta Kitin Değerleri	49
--	----

I. GİRİŞ

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin daha yaygın kullanımı, tedavi protokollerindeki gelişmeler sonucu bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların yaşam sürelerinin uzaması, organ nakillerinin çok daha sık yapılması ve bu tür hastalarda bağışıklık sistemini baskılayıcı ajanların kullanımının artışı gibi nedenlerle mantar infeksiyonlarında son yıllarda büyük bir artış görülmektedir ¹.

Bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların doğal savunma mekanizmaları işlevlerini tam olarak yerine getiremediği için, sistemik mantar infeksiyonlarına duyarlılıkları da artmaktadır. Bu hastalardaki mantar infeksiyonları; şiddetli, hızlı ilerleyen, tanısı ve tedavisi zor olan infeksiyonlardır. Hastalığın klinik spektrumu derinin yüzeysel infeksiyonundan hayatı tehdit eden sistemik infeksiyonlara kadar değişmektedir.

Normal flora elemanı olarak deri, mukoza ve sindirim sisteminde bulunan *Candida* türleri insanda fırsatçı infeksiyonların en önemli nedenlerindendir ¹.

Candida infeksiyonlarına karşı korunmada doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemi önemlidir. Bu sistemlerde yer alan hücresel ve humoral mekanizmalar kandidoza karşı korunmada birlikte çalışır. Mekanik bariyerler, fagositik hücreler, T hücreleri ve antikor üretimi *Candida* infeksiyonlarına karşı savunmanın farklı basamaklarında değişik etkinlikte rol almaktadır ^{2,3}.

Hücreler arası ilişkiler bir yandan iki hücrenin doğrudan doğruya birbirleri ile ilişki kurmaları, bir yandan da oluşturdukları hormon benzeri maddelerle birbirlerini etkilemeleri sonucunda yürütülür. Bağışık yanıtın düzenlenmesinde, B ve T lenfositleri, makrofajlar, monositler gibi

bağışıklık sistemi hücreleri tarafından salınan hormon benzeri aracı maddelere genel olarak “sitokinler” adı verilir. Peptit ya da glikoprotein yapısında olan sitokinler, bağışık yanıt olaylarında, yangısal tepkimelerde, doku onarımında, bağışıklık sistemi hücrelerinin çoğalıp farklılaşmasında görev alır ⁴.

Son yıllarda sitokinlerin gösterilmesi için serolojik yöntemler yanında moleküler yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır. Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile sitokin ifadesinin gösterilmesi duyarlı ve özgöl bir yöntem olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, invaziv kandidoz oluşturulmuş sıçan modelinde İnterlökin 10 (IL-10), İnterferon γ (IFN- γ), Tümör Nekroz Faktör α (TNF- α) gibi sitokinlerin ifadelerinin araştırılması hedeflenmiştir.

II. GENEL BİLGİLER

II. a. Tarihçe

M.Ö. dördüncü yüzyılda Hippocrates ve Galen'in oral lezyon olarak tanımladıkları pamukçuğun altta yatan ciddi hastalıklar ile ilişkili klinik bir belirti olduğu bilinmekteydi. 1839'da Almanya'da Bernard Langenbeck, tifüslü bir hastanın oral lezyonlarından izole ettiği organizmayı "Typhus-Leichen" (tifüs cisimcikleri) olarak tanımlamış, 1841'de Emil Berg tarafından sağlıklı bebeklerde pamukçuğun fungal etyolojisi araştırılmıştır. *Candida albicans* ilk kez 1842'de Gruby tarafından tanımlanmıştır ^{5,6}.

II. b. Taksonomi

Candida; *Mycetae* aleminin *Amastigomycota* bölümüne, *Deuteromycetes* sınıfına, *Blastomyces* alt sınıfına ait *Cryptococcaceae* ailesinin *Candida* cinsinde sınıflandırılmıştır ^{7,10,11,12}.

II. c. Ekoloji

Candida'lar maya şeklinde üreyen mantarların önemli bir grubudur ve 200'den fazla türü tanımlanmıştır. Bitkilerde de yaşayabilen *Candida* türleri, insan ve diğer sıcakkanlı hayvanların birçoğunda kommensal olarak bulunur. Geçiş yolu genellikle yiyecekler, direk temas (giyecekler, yatak, diş fırçaları vd.) olarak bilinmektedir ^{1,10,11}. Bazı türler insan florasının bir parçası olabilir ancak tüm bu türlerin sadece % 10'u insanlarda infeksiyon etkeni olma özelliğine sahiptir. *Candida*'lar ağız boşluğu, sindirim kanalı, vajina, rektal bölge, bazı cilt bölgeleri gibi sağlıklı vücut yüzeylerinden izole edilebilir. *Candida albicans* (*C. albicans*), *C.*

glabrata, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* insanlarda yaygın olarak karşılaşılan türlerdir. *C. albicans*, bu türler arasında en sık izole edilen türdür ^{7,10,11}.

II. d. Mikrobiyolojik Özellikleri

Büyüklüğü 2-6 µm arasında olan *Candida*, tek hücreli, ökaryotik ve kemoheterotrof olup, yuvarlak veya oval biçimdedir. Genellikle tek başına, zincirler oluşturarak ya da küçük yumuşak kümeler şeklinde görünür. Aseksüel yolla tomurcuklanarak (blastokonidya) çoğalma gösterir. Birçok tür, dokuya invaze olduğunda hem yalancı hem de gerçek hif formlarını oluşturur (dimorfizm). Arka arkaya tomurcuklanan blastokonidyaların birbirinden ayrılmayıp uzayarak ve aralarında boğumlar oluşturarak yaptıkları hücre zincirleri yalancı hifleri oluşturur. *C. glabrata* hariç tümü uygun koşullar altında yalancı hif üretir ^{7,10,11,13,14}.

Candida türleri, antibiyotikli (kloramfenikol veya gentamisin içeren) Sabouraud dextrose agar (SDA)'da pH 4-7'de, 24-42 °C'de, 24-48 saatte üretilir. Ayrıca kanlı agar, beyin-kalp infüzyon agar ve triptoz agar gibi bakteriyolojik ortamlarda da üreyebilir. Genellikle kirli beyaz veya krem rengi, nemli, düzgün veya buruşuk kenarlı, düzgün yüzeyli veya göbekli; uzayan inkübasyonla birlikte kıvrımlı hale gelen, mat ya da parlak, maya kokulu yumuşak koloniler oluştururlar. Besiyeri yüzeyinin altında ise yalancı hifler bulunur ^{7,14,15}.

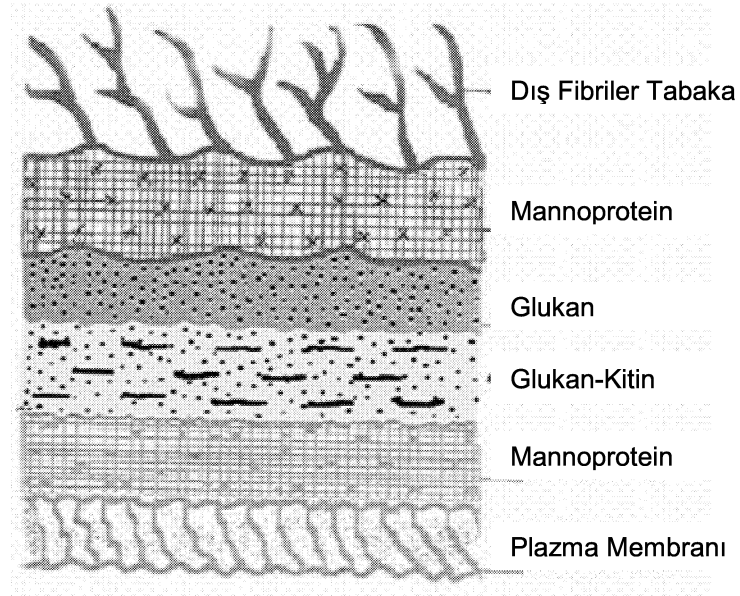
Tüm *Candida* türleri glukozu fermente eder, hiçbirisi nitrati asimile edemez. Sadece *C. guilliermondii*, dulsitolü ve *C. krusei* laktozu asimile eder. *Candida* türleri genellikle üreaz üretmez ve KNO₃'ü kullanmaz, ancak bazı *C. krusei* izolatları üreaz pozitif olabilir. Bu gruptaki maya benzeri mantarların kültürlerinde etanol, aseton ve asetik asit, formik asit, laktik asit, propionik asit, piruvik asit, süksinik asit gibi organik asitlerden zengin metabolik son ürünler oluşur ^{18,19}.

C. albicans iki morfolojik test ile diğer *Candida* türlerinden ayırt edilebilir: Serum içinde 37 °C'de 2 saat inkübe edilirse, çimlenme borusu (germ tüp) oluşumu gözlenir. Mısırunu - Tween 80 agarda ise *C. albicans* tipik olarak iri, küre şeklinde klamidospore oluştururlar. Diğer mayalar da olduğu gibi gram pozitif boyanır; hematoksilin veya giemsa boyalarını çok iyi içine almazlar ¹⁵.

II. e. Hücre Yapısı

Hücre duvarı sert bir yapıda olup, hücreye şekil verir, hif oluşumunda görev alır, protoplastı osmotik değişikliklere karşı korur, ortam ile maya arasındaki ilişkiyi düzenler ve maya hücresinin değişik yüzeylere tutunmasında doğrudan görev alır. Duvar yapısında bulunan bazı maddeler antifungal ajanlar için hedef oluştururken, bazıları aynı zamanda antijenik determinantları taşır. Duvar komponentlerinin %80-90'ı karbonhidratlar, % 5-15'i protein ve % 2-5'i lipidlerden oluşur. Karbonhidratların ise % 20-30'u mannoptein, % 50-60'ı β -glukanlar ve % 0,6-9'u kitin yapısındadır. Polisakkarit olarak mannan, glukan ve kitin içerir. Hücre duvar matriksinin başlıca polisakkaritlerinden olan glukan, β -1,3 dalları içeren β -1,6 D-glukoz rezidülerinden meydana gelir. Ayrıca kitin sentetaz ile sitozolde bulunan kitin, β -1,4 bağları içeren N-asetil-D-glukozaminin dallanmamış polimeridir. β -glukan ve kitin sert bir ağ oluşturarak duvarın yapısal bileşenini oluşturur. Proteinler ve glukoproteinler bu iskelete bağlanır. Mannan ise, α -1,6 bağları olan D-mannozdan oluşur. *C. albicans*'ın maya ve hif formlarında glukan ve mannan içeriği benzerdir fakat hif hücrelerinde kitin miktarı maya hücrelerine göre 3 kat daha fazladır. Elektron mikroskopisi çalışmalarına göre *Candida*'ların hücre duvarı en az 5 katmanlıdır. Maya-hif dönüşümü süresince bu sayı ve kalınlık değişir. Ayrıca ortamda yüksek yoğunlukta şeker varlığında en dıştaki mannoptein kalınlaşır ve fibriller oluşumlar

artar. Hücre duvarı, şekil değişikliğinden birinci derece sorumludur
7,10,11,19,20



Şekil 1: *C. albicans*'ın Hücre Duvar Yapısı ve Katmanları

II. f. Virulans Faktörleri

Candida türleri çoğunlukla genel durumu bozulmuş, birden fazla predispozan faktöre sahip bireylerde hastalık oluşturur ve hastalığın oluşumunda konak faktörleri ile mayanın sahip olduğu virulans faktörleri son derece önemli rol oynar.

Altta yatan bir hastalık (lösemi, AIDS vd.), fagositik fonksiyon bozuklukları (granülositopeni, nütropeni vd.), dış etkenler (intravenöz ilaç kullanımı, geniş spektrumlu antibiyotiklerle tedavi, transplantasyon tedavisi, travma vd.) gibi faktörler hastalığın oluşumunu etkiler ¹.

Konak bağışıklığını yenmek için birlikte rol oynayan ve patogeneizde önemli yeri olan *Candida virulans* faktörleri; adezyon, morfolojik değişim, fenotipik değişim, toksinler, enzimler, biyofilm oluşumu şeklinde sıralanabilir ¹.

II. f. 1. Yapışma (Aderans)

Aderans, mayanın konak ile ilişkisinde ilk basamağını oluşturur ve hücrelerin yüzey özellikleri ile ilgilidir. *C. albicans*'ı bu cins içerisinde en sık hastalık yapan tür olarak öne çıkaran özelliklerin başında mukoza yüzeylerine yapışma yeteneği gelir. *C. albicans* diğer *Candida* türlerine oranla kan damarları, endotel hücreleri, epidermal keratinositler gibi konak hücrelerine daha fazla yapışma yeteneğine sahiptir ^{1,21}. Çeşitli yüzeylere bağlanmasını; şekerler, metal iyonları, pH, ısı gibi çevresel faktörlerin yanı sıra fibrinojen, fibronektin, laminin, tip I ve tip IV kollojen gibi konak proteinleri ve maya hücrelerinin morfolojileri, üreme fazları, yüzey özellikleri, diğer mikroorganizmalar ile etkileşimleri belirlemektedir ¹.

II. f. 2. Morfolojik Değişim

Maya-hif dönüşümünde süreci etkileyen dış faktörler; CO₂, pH, ısı, N-asetil glukoz, aminoasitlerdir.

İnfekte dokularda *C. albicans*'ın hem maya hem de miçel şekli bulunsa da, hif şeklinin maya şekline göre dokuya daha fazla yapışması, fagositler tarafından sindirilememesi, aktif semptomlu infeksiyonla ilişkili olması, plastik yüzeylere yapışmayı sağlayan fibriller yüzey tabakaları oluşturması, çimlenmekte olan hücrelerin daha virulan olması, hifin patogeneiz ve virulansdaki rolünü kanıtlayan bulgulardır ^{1,10,11,21}.

II. f. 3. Fenotipik Değişim

C. albicans'ın düzgün yüzeyli, beyaz renkli koloniler oluşturan yuvarlak-oval, tomurcuklu "beyaz" faz hücreleri; geniş yüzeyli, yassı, yüzeyi pürüklü, gri renkli koloniler oluşturan uzun, büyük "opak" faz hücrelerine dönüşür (W-O değişimi). Bu değişimin, mayanın konak epitel hücrelerine tutunmasında ve nötrofil aktivasyonunun bozulmasında etkili olduğu ve opak koloni oluşturan suşların virulansının daha düşük olduğu bildirilmiştir ^{7,8,21,22,36}.

II. f. 4. Toksinler ve Enzimler

C. albicans'ın maya fazında endotoksin benzeri maddeler ve hemolizin üretimi gösterilmiştir.

Hücre dışı enzimlerden olan salgısal aspartil proteinaz (SAP), adezyon ve invazyonda etkilidir. Lezyon bölgesinde albumin, hemoglobin, keratin, salgısal IgA gibi proteinleri azalttığı, düşük pH'da aktif olması nedeniyle vajen kolonizasyonuna yardımcı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ^{10,11,20}.

C. albicans fosfolipazları, hem konak hücrelerine penetrasyonu, hem de hücre harabiyeti oluşturma gücünü artırır. Fosfolipaz, membran lipidlerini hidrolize ederek hücre membranına zarar verir ^{23,24,25}.

Demir, birçok canlı tarafından indirgenme-yükseltgenme enzimlerinin kofaktörü olarak kullanılır. *Candida* türlerinin patojenitesini etkileyen önemli bir faktörün de sideroforlarını kullanabilmesi olduğu gösterilmiştir ²⁶.

II. f. 5. Biyofilm Oluşumu

Sistemik *Candida* infeksiyonları sıklıkla kateter, yapay eklem ve protez kalp kapağı gibi medikal aletlerin varlığı ile ilişkilidir. Bu aletlerin üzerine yapışıp biyofilm üretimi ile kolonizasyon oluşturan *Candida* türlerinde virulans derecesi ve biyofilm oluşturma yeteneği arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Ayrıca tıbbi malzemelerin üzerine yapışabilmesi ve biyofilm oluşturunabilmesi kandidemi oluşumu ve antifungal direnç riskini artırmaktadır. *C. albicans* ve *C. parapsilosis* kateter kaynaklı infeksiyonlara yol açabilmektedir ^{1,23}.

Kateterde ortaya çıkan biyofilmlerde hem maya hem de konağa ait faktörlerin rol aldığı; bu yapışma ve kolonizasyon için mantarın “slime faktör”ünün, konağın da fibrin ve fibronektinlerinin gerekli olduğu bildirilmektedir. Biyofilmlerdeki hücrelerin ana hücrelerden tamamen farklı fenotipik özellik gösterdiği, klinikte kullanılan antifungallere de ana hücrelere oranla daha dirençli olduğu bildirilmiştir ²⁷.

II. g. *Candida* İnfeksiyonları ve Patogenez

C. albicans ağız boşluğu, sindirim kanalı, genital sistem florasının üyesi olan bir mikroorganizmadır. Mayanın çoğalması; fiziki bariyerler, endojen flora ile rekabet ile konak savunma mekanizmaları sayesinde baskılanmaktadır. Konağın bağışıklık sistemindeki baskılanma ya da doğal bariyerlerinin bozulması halinde kolonize olan *C. albicans* endojen kaynaklı fırsatçı infeksiyonlara neden olabilmektedir. Ayrıca santral venöz beslenme ve hastane çalışanları yolu ile ekzojen kaynaklı infeksiyonlar da meydana gelebilmektedir ^{1,7,10,11}.

Candida infeksiyonları primer olarak kutanöz, mukokütanöz (yüzeyel) ve sistemik (derin) olmak üzere 3 gruba ayrılır. Yüzeyel kandidozlar deri ve mukozaların, derin kandidozlar ise iç organ ve sistemlerin infeksiyonlarıdır. Yüzeyel kandidozda; *Candida*, deri veya

mukozadaki bir açıklıktan doku içine yabancı hüfleri sayesinde girer, yabancı hüflerden meydana gelen blastokonidyumlar ile dokuya yayılım gerçekleştirilir ^{7,15}. Derin kandidozlarda; genelde sindirim sistemindeki mevcut kolonizasyon, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda kan yolu ile yayılarak böbrek, deri, göz, kalp, karaciğer, dalak gibi organlar başta olmak üzere çeşitli organ ve sistemlere yerleşim söz konusudur ¹.

II. g. 1. İmmunopatogeneze

Yabancı bir ajanın organizmaya girişini önlemede ilk savunma mekanizması deri, mukus, silialı epitel, mide asidi ve safra gibi doğal bariyerlerdir. Eğer bu bariyerler bozulur veya ajan başka bir yolla içeri girerse ateş, interferon, kompleman, doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri), nötrofiller, makrofajlar gibi hızlı lokal yanıt oluşturan, antijene spesifik olmayan doğal bağışık yanıt devreye girer. Doğal bağışıklığın yetersiz kaldığı durumlarda ise, antikor ve T hücrelerinin oluşturduğu kazanılmış bağışık yanıt oluşur. *Candida* infeksiyonlarına karşı gelişen bağışıklık, doğal ve kazanılmış bağışıklık arasındaki karmaşık bir ilişki sonucunda gerçekleşmektedir ^{3,7,8,16}.

Kompleman sistemi, büyük kısmı karaciğerde sentezlenen, kan ve hücre dışı sıvıda bulunan 20'den fazla proteini içeren bir sistemdir. Kompleman, antijen - antikor bileşimine bağlanarak aktif hale gelir. Bu yolla hücre erimelerine yol açar. Ayrıca değişik yollarda aktive olarak organizmanın savunmasında yer alır.

Kompleman aktivasyonu, klasik ve alternatif yol olmak üzere iki ana yolla gerçekleşir. Kompleman sisteminin herhangi bir yolla aktivasyonu sonucunda birçok mikroorganizma, membran saldırı kompleksinin etkisiyle lizise uğratılmaktadır. Ancak mantarlarda direk lizis mekanizması, mantar hücre duvarı kalın olduğu için gerçekleştirilemez. Kompleman, opsonin

gibi görev yaparak fagositler üzerindeki kompleman reseptörlerine bağlanmayı ve fagositozu kolaylaştırır^{3,17}.

Fagositoz özelliğine sahip olan nötrofiller ve monosit/makrofajlar kandidasidal aktivite gösterirler ve mayalara karşı savunmada birinci basamakta rol alırlar. Fagositlerin kullandıkları başlıca mekanizmalar; oksijen bağımlı veya bağımsız mikrobisidal mekanizmalar veya fungisidal aktiviteye sahip lizozomal katyonik proteinlerin salınması sonucu oluşan yok etme mekanizmalarıdır. Bu mekanizmalar, hem hücre dışı ortamda hem de hücre içinde fagosite edilmiş mayalar üzerinde etkilidir. Fagositler, büyük hifleri ve yalancı hifleri fagosite edemedikleri için bunlara karşı hücre dışı yok etme mekanizmalarını kullanırlar^{2,3}.

Doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri), infeksiyonlara karşı savunmada doğal bağışıklığın ana bileşenlerinden biridir ve infeksiyon etkeni ile ilk karşılaşmada rol oynarlar^{2,7,8}.

Lenfositler, B ve T hücreleri olmak üzere iki ana gruba ayrılır. B hücrelerinin esas fonksiyonu antikor üretimidir. Bunun yanı sıra antijenlerle birleşir, onları işler ve T hücrelerine sunabilir. Aktive B hücreleri ya hafıza hücrelerine dönüşür ya da plazma hücrelerine farklılaşır. T hücreleri ise yardımcı T hücreleri (Th), sitotoksik T hücreleri (Ts) olarak ikiye ayrılır. Bu hücreler salgıladıkları sitokinlerle bağışık ve inflamatuvar yanıtı düzenler; ayrıca infekte hücrelerin, yabancı hücrelerin ve tümör hücrelerinin öldürülmesinde etkilidirler.

II. g. 2. Sitokinler

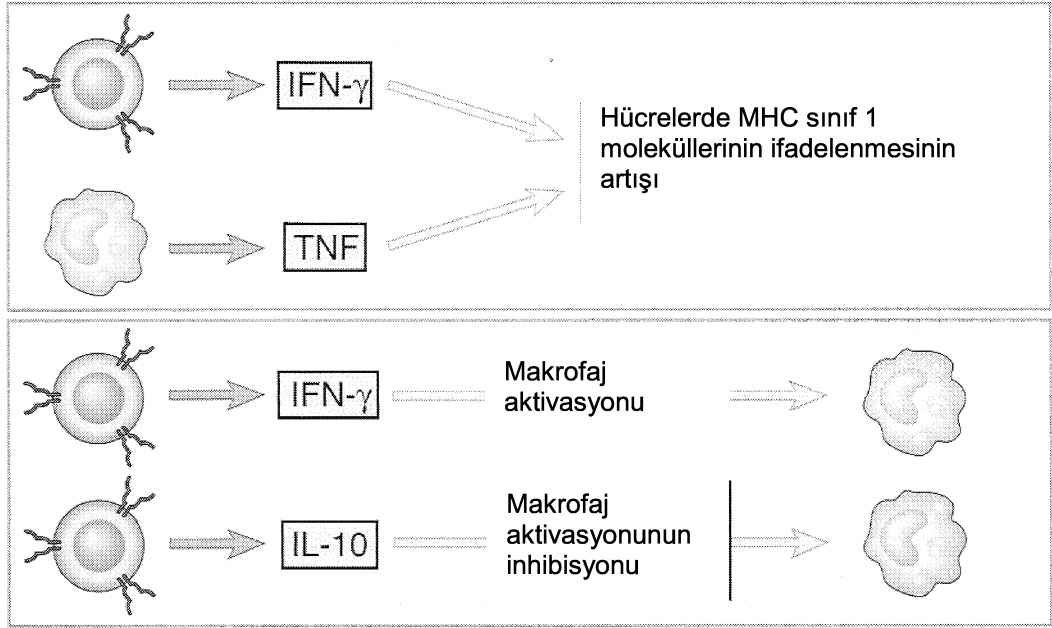
Küçük sinyal proteinleri olan sitokinler, genellikle salındıkları hücreler üzerine doğrudan (otokrin) ya da salındıkları hücre çevresindeki hücrelere (parakrin) etkilidir. Sitokinler, doğal ve kazanılmış bağışık yanıtı kontrol etmede, yangısal tepkimelerde, infeksiyonlara karşı savunmada, T ve B lenfositlerin çoğalıp farklılaşmasında rol oynarlar. Sentezinde uyarı

gerektiren sitokinler, antijen için spesifik olmamakla beraber, belirli bir fonksiyonun aktivasyonuna veya baskılanmasına yol açabilir. Kendi aralarında agonist ve antagonist etkileşimler gösterebilirler. Genellikle serumda bulunmayan sitokinler, oluşturuldukları hücrelerin hemen yakınında ya da hücrenin üzerinde belirli reseptörlere bağlanarak etkili olurlar^{2,4,7,8,28}.

İnfeksiyonla birlikte doğal ve kazanılmış bağışıklık mekanizmalarının aktive olmasında çeşitli sitokinlerin rolü olduğu bilinmektedir.

II. g. 2. 1. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)

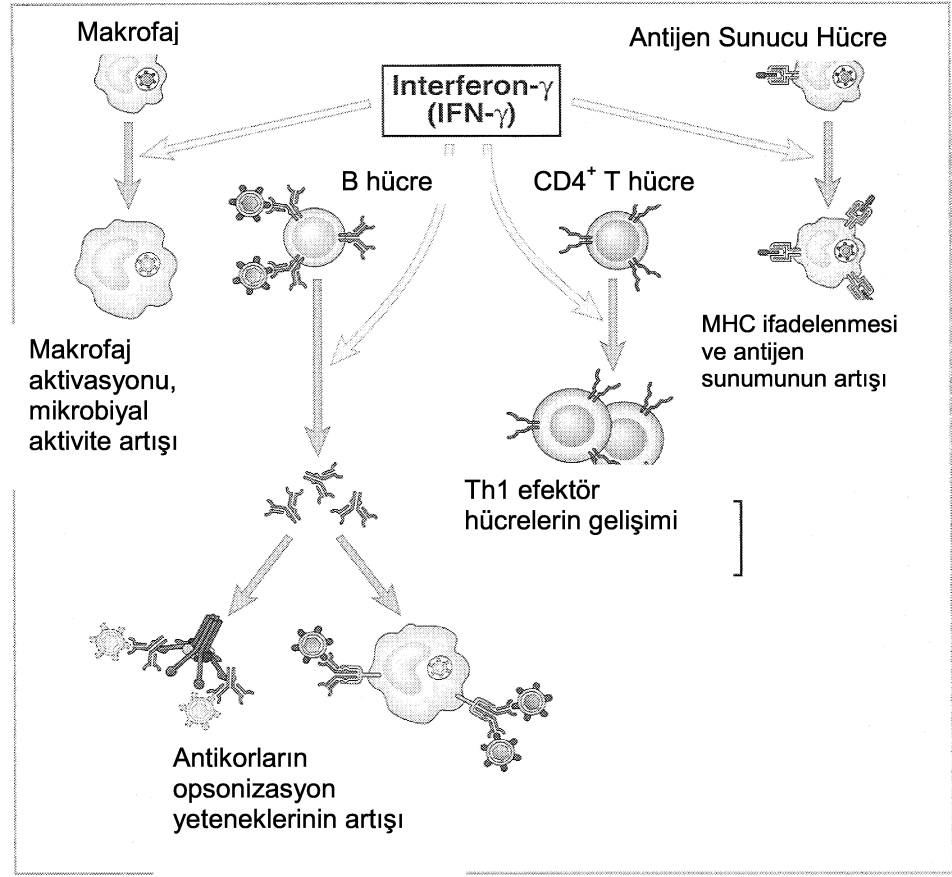
Gram (-) bakterilere ve diğer infeksiyöz mikroplara karşı gelişen akut inflamatuvar yanıtın ana mediyatörüdür. Mononükleer fagositler, T lenfositler, NK ve mast hücrelerinden sentezlenir. LPS (lipopolisakkarit) ile uyarım sonucunda makrofajdan salınmaya başlar. Ayrıca T ve NK hücreleri de salgıladıkları IFN- γ ile TNF- α salınımını artırır. İnfeksiyon bölgesine nötrofil ve monositlerin çekilmesinde, makrofajların aktive olmasında, akut inflamasyonun oluşumunda ve etkilerinin düzenlenmesinde görev alırlar^{2,3,4,28,52}.



Şekil 2: Bazı Sitokinlerin Özellikleri ²

II. g. 2. 2. İnterferon Gama (IFN-γ)

Makrofajların uyarılmasında anahtar sitokindir. Doğal ve kazanılmış bağışıklıkta kritik öneme sahiptir. NK hücreleri, CD8⁺ ve CD4⁺ T hücrelerinden salınır. Th hücrelerinin Th1 alt grubunun belirleyici sitokindir. IFN-γ'nın Th1 indükleyici etkisi indirektir. IFN-γ ile aktive olan makrofajlarda immunglobulinlerin Fc parçalarına karşı reseptör oluşumu artar. Böylece immün komplekslerin ve antikorla kaplanmış infeksiyöz etkenlerin ortadan kaldırılmasını hızlandırır. Antijen sunucu hücrelerin üzerindeki sınıf 1 ve sınıf 2 MHC moleküllerinin salınımını artırır. Th2 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederler. NK hücrelerinin sitolitik etkilerini ve nötrofilleri uyarırlar ^{2,4,7,8,9,28}.



Şekil 3: IFN-γ ve Görevleri ²

II. g. 2. 3. İnterlökin 10 (IL-10)

Aktive makrofaj ve dendritik hücrelerin inhibitörüdür. Doğal bağışıklık olaylarının ve hücresel bağışıklığın kontrolünde rol oynar. Aktive Th2, CD8⁺ T ve B lenfositleri ile makrofajlardan salınır. Th1, NK ve antijen sunucu hücrelerin üretimini inhibe eder, hücresel bağışıklığı baskılar ^{2,4,7,8,9}.

II. h. Kandidozda Başışıklık

Candida türleri hücresele ve humoral başışıklık sistemlerinin ikisini de aktive etmektedir. Antikor aracılı humoral başışıklık, sistemik kandidozda hücresele başışıklık kadar önemli rol oynamamaktadır. Humoral başışıklık özellikle opsonizasyon yolu ile *Candida* hücrelerinin makrofajlar tarafından daha kolay yutulmasını sağlar. Bunun dışında antikor aracılı başışıklık sisteminin ve bu sistem faktörlerinin kandidozdaki rolü tartışmalıdır^{2,7,8,9,29}.

Candida infeksiyonlarında koruyucu özellikte olan hücresele başışıklık, T hücre kontrolünde hareket eden makrofajlar, nötrofiller ve NK hücrelerinden oluşmaktadır. *C. albicans* blastokonidyasının mononükleer fagositik hücreler ve makrofajlar tarafından hücre içinde öldürölmesinin ilk basamağı fagositozdur. Mannan, glukan, ve diğere hücre yapıları makrofajları uyarır. Araşidonik asit, IL-1 β , IL-6, TNF- α makrofajlardan salınır. TNF- α , makrofajların mikrobisidal aktivitesini düzenlediğı gibi, nötrofillerin *C. albicans* hiflerini öldürmesini de artırır^{28,30,52}.

C. albicans'ın kompleman aktivasyonunda kullandığı temel mekanizma alternatif yoldur. Kompleman yolunda C5 bileşigi erken dönemde mayaların eliminasyonunda önemlidir ve C5 defekti bulunan fareler yaygın hastalığa karşı daha duyarlıdır³¹. Yapılan çalışmalarda *C. albicans*'ın mannan antijenine karşı gelişen antikorların klasik kompleman yolunu aktive ederek nötrofillerin opsonofagositik etkisine katkıda bulundukları gösterilmiştir³².

NK hücrelerinin *C. albicans* ile karşılaştırılması sonucunda sitotoksik aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. NK hücrelerinin *Candida*'lara karşı doğal hücresele sitotoksik etkilerinin bulunduğı bildirilmiştir^{2,33}.

Sistemik kandidozda gelişen başışıklığın asıl elemanları T hücreleri olsa da diğere başışıklık sistemi hücrelerinin de rolü olduğu düşünülmektedir. Nötropenik hastalarda bütün kandidoz çeşitleri

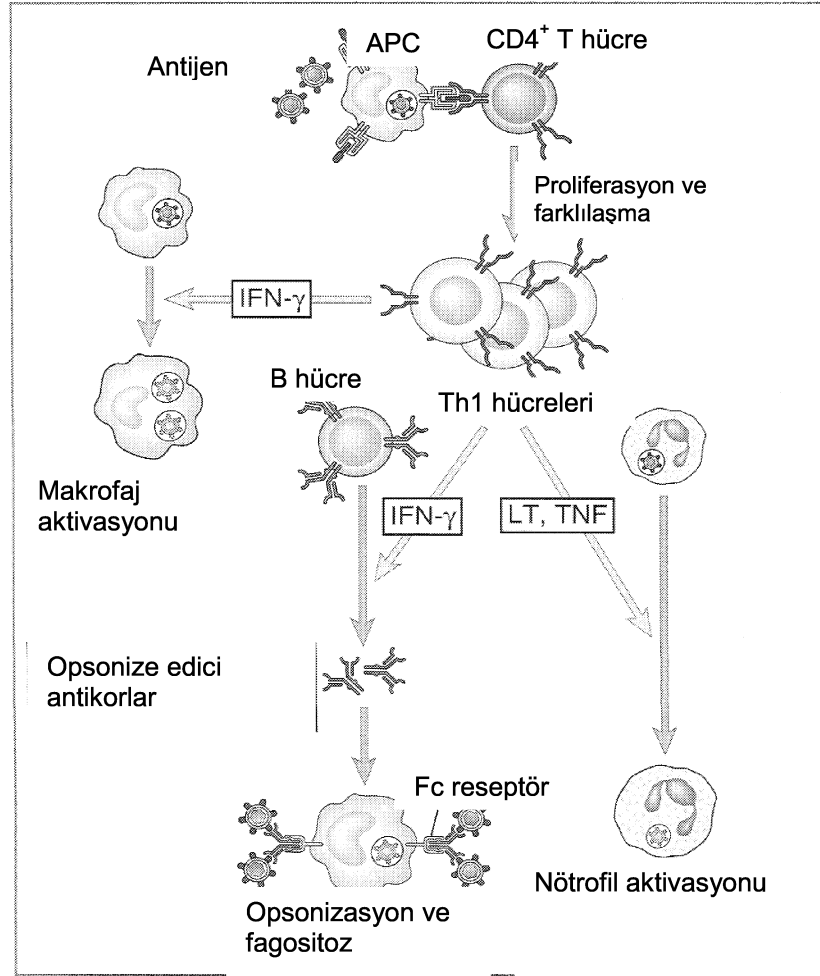
görülürken, hücresel bağışıklık sistemi bozulmuş olan bireylerde daha çok mukokutanöz kandidoza rastlanmaktadır.

Polimorfonükleer (PMN) lökositlerin de kandidoz patogeneğinde önemli olduğu anlaşılmıştır. PMN hücreleri myeloperoksidaz gibi enzim ve defensinleri ile *Candida* türlerinin fagositozundan sorumludur^{16,17,36}. PMN lökositler, sitokin reseptörleri içermektedir ve bu hücrelerin uygun sitokinlerle uyarılması mantarların yok edilmesini artırıcı etki oluşturabilir. In vivo IFN- γ uygulaması kronik granülomatöz hastalığı olanlarda ciddi infeksiyon sıklığını azaltmıştır. IL-4 (İnterlökin-4) ve IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin nötrofillerin kandidasidal aktivitesini bozduğu belirtilmiştir^{10,11,28}.

Mononükleer hücreler fungal patojenlere karşı koruyucu yanıtta önemli rol oynar. Monosit ve makrofajların yüzeylerinde IgG1 ve IgG3 Fc parçası, C3b ve çeşitli lenfokinlere ait reseptörler ve diğer molekülleri bağlayan reseptörler bulunmaktadır. Böylece mikroorganizmaların fagositoz işlemi kolayca gerçekleştirilir³.

Kandidoz ve diğer mantar infeksiyonlarının immünregülasyonunun anlaşılması için kazanılmış bağışıklığın Th1/Th2 mekanizmasının tam olarak açıklanması çok önemlidir. Th yanıtı, Th1 ve Th2 yanıtı olmak üzere iki grupta gerçekleşir. Bu yanıt salgılanan sitokinlere göre sınıflandırılır.

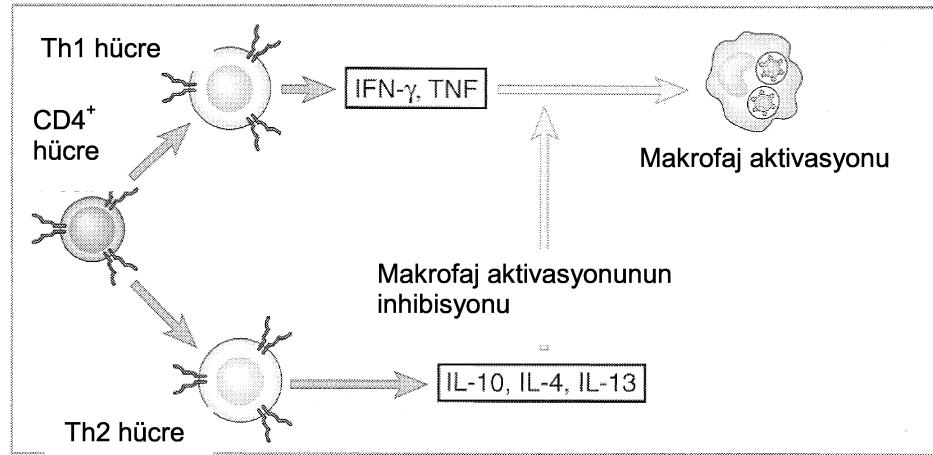
Th1 yanıtı, genellikle infeksiyonun erken evresinde lokal bir yanıt olarak meydana gelir; inflamatuvar sitokinlerden IFN- γ , IL-2, IL-12'nin üretimlerinin artışı ve antifungal efektör hücrelerin makrofaj ve PMN lökositlerin uyarılması ile birliktelik gösterir. Bu hücrelerin salgıladığı sitokinler, Th2 tarafından üretilen IL-10 gibi sitokinlerle inhibe edilir. Th1 hücreleri tarafından salınan sitokinler; TNF- α , IL-1, IFN- γ , IL-12, IL-15'dir. Bu sitokinlerin makrofaj ve nötrofilleri aktive ederek bu hücrelerin kandidasidal etkilerini artırdığı düşünülmektedir^{7,8,9,10,11,34,36}.



Şekil 4: Sitokin ve Hücre Etkileşimleri ²

Th2 yanıtı, lenf nodlarında antijenin B hücreleri, dendritik hücreler veya makrofajlarla sunulması sonucu genellikle geç gelişen bir bağışık yanıttır. Th2 hücreleri tarafından salgılanan sitokinler de; B hücre farklılaşması, immunoglobulin sınıf seçimi, hafıza B hücreleri ve plazma hücrelerinin oluşumunu uyarmaktadır. Th2 hücreleri tarafından salgılanan sitokinler; IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, TGF- β gibi sitokinlerdir. Th2 hücreleri, IL-4 ile uyarılırken, IFN- γ ile baskılanmaktadır ^{2,3,28}. Bu grup sitokinler Th1 yanıtının gelişimini inhibe eder ve fagositik efektör hücrelerin

aktivasyonunu engeller. Th2 yanıtının yüksek olması, konakçının ilerleyici tarzda enfeksiyona maruz kaldığının göstergesidir ^{28,34,36}.



Şekil 5: T Lenfositleri ve Sitokinleri ²

Fungal enfeksiyonlara karşı primer koruyucu yanıt Th1 aracılı inflamatuvar reaksiyonlarla gerçekleşir. Bu yanıtın eksik olduğu hastalar fungal enfeksiyonlara duyarlıdır. Th1 yanıtının kandidoza karşı koruyucu etkisi olduğu, Th1 yanıtının Th2 yanıtına baskın olduğu düşünülmektedir ^{16,28,36,37}.

Tüm mikroorganizmalarda olduğu gibi, mantarlar da, antijen sunucu hücreler tarafından işlendikten sonra T lenfositlerine sunulur. Fungal antijenler lizozomun asidik veziküllerinde peptid parçalarına ayrılır. Bunlar MHC (major histokompabilite kompleksi) sınıf II antijenlerine bağlanarak, MHC-peptid kompleksi şeklinde hücre yüzeyine sunulur ve spesifik CD4⁺ Th hücreleri tarafından tanınır ³⁶.

Çok hücreli canlılarda doğal direncin yabancı mikroorganizmaları algılamasında 'Toll Benzeri Reseptörler' (Toll like receptors; TLR) çok önemlidir. Bu reseptörler patojen mikroorganizmaların yüzeyindeki bazı

özel bölgeleri tanıyarak, doğal direncin yanı sıra özgül bağışıklığın aktivasyonunda da rol oynamaktadır.

C. albicans'a karşı savunmada TLR2 ve TLR4'ün önemi gösterilmiştir ^{7,8,36,38}. TLR2, makrofajlardan *C. albicans* aracılığı ile TNF- α sekresyonu için gerekli bir moleküldür. TLR2'ye spesifik antikorlar, insan mononükleer hücrelerinde *C. albicans*'ın uyardığı TNF- α ve IL-1 β salınımını inhibe eder ^{2,7,8,9}.

II. 1. Kandidozda Tanı

Candida'ların saptanmasında direk mikroskopi basit ve ekonomik olmasına rağmen yanlış sonuçların alınabileceği de göz ardı edilmemelidir. Yalancı hif ya da gerçek hif formları bulunan mayaların ışık mikroskobu ile görülmeleri oldukça kolaydır. İdrar ve kan örneklerinde mikroskopi kolay bir yöntemdir.

Candida türlerinin kan kültürlerinden izole edilmesi için; klasik yöntemlerin yanı sıra son yıllarda kullanılmaya başlanan otomatize ve hızlı sistemler de vardır. Ancak bu yöntemler gerek birbirleri ile ve gerekse klasik yöntemlerle her zaman uyumlu değildir. Horvart ve ark. yaptıkları denemelerde, yeni kullanıma giren otomatize iki kan kültürü yöntemi BacT/ALERT ve BACTEC sistemlerini karşılaştırarak güvenilirliklerini belirlemeye çalışmış ve *Candida* türlerinin çeşitli ortamlarda bulunma durumlarına göre BacT/ALERT sisteminin BACTEC sistemine oranla daha duyarlı (% 90) olduğunu belirlemişlerdir ^{40,42}.

Değiştirilmiş bir kan kültür yöntemi olan "lisis santrifügasyon sistemi"nin invaziv kandidemi olgularında kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu yöntemin duyarlılığı % 43 olarak belirlenmiştir ⁴³.

Birçok *Candida* türünün tanısında karbonhidrat asimilasyon ve fermantasyon testleri gibi klasik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler ticari sistemler olarak piyasaya sunulmuştur (ID32C). Daha hızlı ve az

zahmetli fenotipik tanımlama sağlayan RapID Yeast Plus System % 94,1 duyarlılıkla 4-5 saatte sonuç vermektedir ^{39,40}.

Candida türlerinin ayrımında kullanılan kromojenik besiyerinde (CHROM agar) her türün belirli renk ve özellikte üremesi esasına dayanılarak tanımlama yapılmaktadır ^{40,41}.

En son kullanıma sunulan FTIR (fourier transform infrared spectroscopy) yöntemi mayanın kimyasal özelliklerine bakılarak türlerin net olarak birbirinden ayrılmasına ve kısa süre içerisinde tür tanımı yapılmasına olanak sağlamaktadır ⁴⁴.

İnvaziv kandidozun mikrobiyolojik ve klinik tanınmasındaki problemler, kültüre dayalı olmayan tekniklerin doğmasına neden olmuştur. *Candida*'ya yönelik oluşturulmuş antikorların tanınmasıyla başlayan tanı aşamaları, günümüzde mayanın hücre komponentleri (D-arabinitol, mannoz, hücre duvarın bir parçası olan β -glukan) ve *Candida* nükleik asiti hedef alınarak oluşturulmuş moleküler tekniklerle tanı kolaylaştırılmaya çalışılmaktadır. Özellikle kültürde üretilmeyen etkenlerin moleküler yöntemler kullanılarak gösterilmesi tanıda önemli avantajlar getirmiştir. Etken kültürde üretilse bile tür tanımı yapılması için moleküler yöntemlerden faydalanılabilir.

Sistemik kandidozun sadece klinik belirtiler ile tanınması oldukça zordur. Bu yüzden, tanı için kültür, serolojik, histopatolojik ve moleküler yöntemler kullanılmalıdır. Moleküler yöntemlerin kullanılmasının esas amacı, patojen mantarın klinik örnekte kültürü yapılmadan önce saptanması veya geleneksel yöntemlerle kültürde üretilmiş olan mantarın hızlı tanımlanmasıdır. Moleküler yöntemler diğer tanı yöntemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda, bu gerekliliğe cevap verebilecek geniş olanaklar sunmaktadır ^{20,46,47,49}.

Son yıllarda çeşitli amaçlarla da kullanılan PCR yöntemi, birçok klinik örnekte mikroorganizmaya ait yapıları türe özgül olarak kısa sürede tespit edilebilmektedir ^{46,49,50}.

Fungal infeksiyonların tanısında da kullanılan PCR yöntemi ile mantara ait duvar komponenti olan kitinin, tanısal değeri olmamakla birlikte, dokuda mantar varlığı doğrulanması bakımından önemli olduğu düşünülmektedir. Özellikle hayvan modellerinde, mantar yükünü göstermekte kullanılmaktadır ^{66,67}.

Kitin, β -1,4 bağları içeren N-asetil-D-glukozaminin dallanmamış polimeridir. β -glukan ve kitin sentetazlar ile birlikte sert bir ağ oluşturarak duvarın yapısal bileşenini oluşturur. “Tomurcuk skarı” denilen bölgede bulunması asıl işlevini oluşturur. Kitin sentetazlar, yavru hücrede doğum izinin tamiri, septumun oluşumu, bölünme sonrası ana hücrede tamir mekanizmalarından sorumludur ⁴⁵.

II. i. Polymerase Chain Reaction (PCR)

İlk kez Kary Mullis tarafından uygulamaya başlatılan PCR; özgül bir kalıp kompleksinin primerler aracılığıyla çoğaltılması esasına dayalı in vitro bir yöntemdir ⁵¹. Bir test tüpü içinde gerçekleştirilen PCR’da, in vivo nükleik asit çoğaltılması örnek alınmıştır.

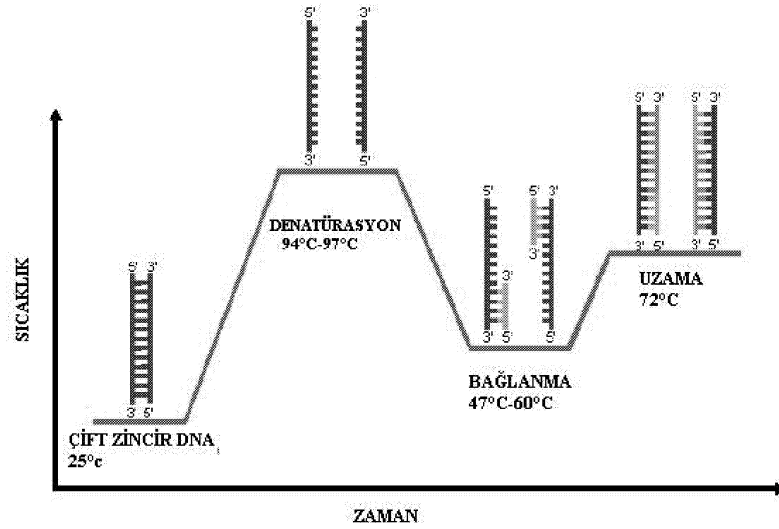
PCR reaksiyonu temel olarak çoğaltılması planlanan hedef bölgenin iki ucundaki DNA dizilerini özgül olarak tanıyıp karşı iplikçiklerini hibridize eden iki oligonükleotid primer, primerlere bağlanıp bunlara 3’ ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz, sentez için gerekli olan deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP; adenin (A), guanin (G), sitozin (C), timin (T)), polimerazın çalışması için gerekli olan tampon maddeler ve kofaktör olan Mg^{+2} iyonları kullanılarak bir DNA parçasının çoğaltılması esasına dayanmaktadır.

PCR temel olarak üç aşamalı bir yöntemdir. Bunlar;

1- Denatürasyon: Çift iplikli kalıp DNA'nın birkaç saniye 94-96 °C ısı ile tek iplikli DNA'ya ayrılmasıdır.

2- Bağlanma (annealing): Örnek birkaç dakika 30-60 °C'de tutularak primerin ssDNA (tek zincirli DNA)'daki hedef bölgelere hibridizasyonu sağlanır. Bu, hidrojen bağlarının yardımı ile olur. Bağlanma ısı sadece DNA/DNA eşleşmesine imkan sağlayacak kadar yüksek olmalıdır.

3- Uzama (extansiyon=elongasyon): DNA polimeraz enzimi yardımı ile ssDNA kalıplarına bağlanan primerlerin 5'-3' yönde uzatılmasıdır.

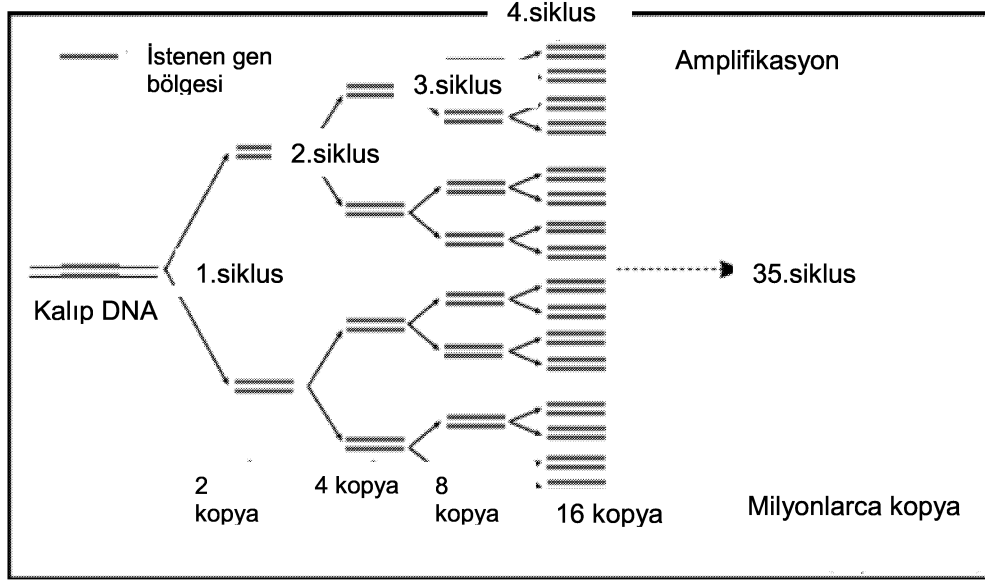


Şekil 6: PCR Yönteminin Aşamaları

PCR çalışmalarında reaksiyonun gerçekleşmesi için küçük miktarda hedef DNA (1-100ng kadar) örnek çalışma solüsyonu içerisine ilave edilir. Daha sonra örnekteki hedef çift sarmal (ds) DNA'nın, tek sarmal (ss) DNA'ya dönüştürülmesi sağlanır (denatürasyon). Tek DNA

iplikçiklerinin karşıtı, 20-30 baz çifti (bp) uzunluğundaki sentetik oligonükleotit diziler, DNA/RNA heterodubleksini oluşturmak üzere primer gibi kullanılır. Spesifik bir bölgenin amplifikasyonu için hedefi sınırlamak amacıyla ikinci primer kullanılır. Primerlerden birisi ssDNA zincirinde başlatıcı bölgeyi oluştururken, ikincisi de diğer zincir üzerinde sonlandırıcı bölgeye bağlanır (bağlanma). Taq DNA polimeraz enziminin yardımıyla, primerlerin bağlandığı bölgeden itibaren her ssDNA zincirinin komplementeri oluşturulur (uzama). Böylece iki adet dsDNA (çift iplikli DNA) oluşur. Oluşan dsDNA'lar, yeni amplifikasyon için kalıp görevini üstlenir. Bu işlem 30 siklus tekrarlandığında birkaç saat içerisinde, hedefin kopyası elde edilebilir^{51,52}.

Her primerin uzayan ürünü diğer primere kalıp görevi gördüğünden, her siklus, bir önceki siklusta meydana gelmiş olan DNA parça miktarını ikiye katlamaktadır. Bu geometrik birikim ile birkaç saat içindeki özgül hedef parçanın milyonlarca kopyası oluşmaktadır⁵¹.



Şekil 7: PCR Yöntemi İle Oluşan Ürünler

II. i. 1. Oligonükleotid Primerler

Hedef DNA bölgesini çoğaltmak için genellikle 20-30 nükleotid uzunluğunda primerler kullanılmaktadır. Daha uzun primerler kullanıldığında özgüllükte bir yükselme olmadığı gibi gereksiz yere maliyet artışı olmaktadır. Daha kısa primerler kullanıldığında ise istenmeyen bölgelere bağlanma meydana gelebilmekte ve özgül olamayan çoğaltma ürünleri ortaya çıkabilmektedir. Primerlerin mümkün ise ortalama olarak 4 bazın her birinden eşit sayıda içermesi ve tekrarlayan, sadece pürin ve pirimidin içeren dizilerden kaçınılması gereklidir. Primerlerin 3' ucunun guanin (G) ve sitozin (C)'den zengin olması bağlanmayı artırdığından tercih edilmelidir. Ayrıca primerlerin kendi kendilerine ve birbirleri üzerine bağlanabilirliğinin olmamasına dikkat edilmelidir. İki primerin ayrılma-bağlanma sıcaklıkları (Melting temperature= T_m) birbirine mümkün olduğunca yakın seçilmelidir ^{52,53}.

II. i. 2. DNA Polimeraz

PCR tekniğinde ısıya dayanıklı DNA polimerazlarının kullanılmaya başlanması, PCR'ın araştırma ve klinik laboratuvarlarda rutin bir teknik haline gelmesine neden olmuştur. PCR çalışmalarında kullanılmak üzere *Thermus aquaticus* adlı sıcak sularda yaşayan bir bakterinin ısıya dayanıklı olan DNA polimerazı (Taq DNA polimeraz) izole edilmiştir. Taq DNA polimerazın optimum çalışma sıcaklığının 72 °C civarında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 95 °C'de 40 dk. bekletildiğinde enzim aktivitesinin hâlâ % 50'sinin korunduğu görülmüştür. Taq DNA polimerazın kullanılmaya başlaması ile hem her döngüden sonra reaksiyon karışımına yeniden polimeraz eklenmesine gerek kalmamış, hem de primerlerin özgül bölgelerine bağlandıktan sonra 37 °C gibi düşük bir sıcaklığa inilmediği için, istenmeyen yerlere bağlanmaları engellenmiştir^{52,53}.

DNA polimerazlar, orijinal ana DNA zincirlerinden bir tanesi kalıp olarak kullanılarak yeni bir tamamlayıcı DNA zinciri oluşturulurken, monomer deoksinüklotid trifosfatlardan uzun polinükleotid zincirlerin sentezine katalize eden enzimlerdir. Yalnızca DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, spesifik bölgelerin çoğaltılması gerçekleştirilir. Kullanılan polimeraz enzimine bağlı olarak kopyalanarak çoğaltılacak olan bölgenin uzunluğu Taq DNA polimeraz için 2 kilobazdan (kb) küçük, en fazla ise 40-50 kb olabilmektedir^{51,53}.

II. i. 3. Deoksinükleozid Trifosfatlar (dNTPs)

Saf deoksinükleosid trifosfatların dördünün ayrı ayrı bulunduğu veya dördünün bir arada bulunduğu stok solüsyonlar mevcuttur. Stok solüsyonlar çoğunun pH'sı NaOH ile 7,5'e ayarlanmıştır. PCR için genel olarak 100 µM dNTP konsantrasyonu gerekli olmakla birlikte daha düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100 µM) Taq DNA polimeraz daha iyi çalışmaktadır. Bununla birlikte optimal dNTP konsantrasyonları MgCl₂

konsantrasyonuna, reaksiyon durumuna, primer konsantrasyonuna, çoğaltılan ürünün uzunluğuna ve PCR döngü sayısına bağlıdır. Bazı PCR'ların optimizasyonu sağlamak için en uygun dNTP konsantrasyonunun ampirik olarak belirlenmesi gerekebilmektedir ^{51,52}.

II. i. 4. Tamponlar

PCR'da DNA polimerazın daha iyi çalışmasını sağlayan birçok tampon bulunmaktadır. Fakat 1988 yılında Saiki ve arkadaşlarının tanımlamış olduğu tampon veya buna benzer tamponlar genel olarak kullanılmaktadır. Bu tampon final konsantrasyon olarak 10 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl , 1,5 mM MgCl₂, % 0,01 jelatin, % 0,01 NP40 ve % 0,01 Tween 20 içermektedir.

II. i. 5. MgCl₂

Mg⁺², DNA polimeraz enziminin çalışmasını sağlayan önemli bir kofaktördür. MgCl₂ ün son reaksiyon karışımındaki konsantrasyonu farklı oranlarda olabilmektedir. Bu nedenle en uygun olan MgCl₂ konsantrasyonunu belirlemek için 0,5-5,0 mM aralığındaki MgCl₂ konsantrasyonlarının denenmesi gereklidir. Mg⁺² iyonları, polimerizasyon sırasında dNTP'ların yeni yapılmakta olan zincire eklenmesi çok önemlidir. Ayrıca polimeraz aktivitesini stimüle ettikleri gibi çift zincirli DNA'nın ayrılma-bağlanma sıcaklıklarını artırır ve primerlerin kalıp DNA'ya bağlanmalarını kolaylaştırır. MgCl₂ konsantrasyonun PCR ürünü ve özgüllük üzerine çok önemli etkileri vardır. 1,0-1,5 mM MgCl₂ konsantrasyonu genellikle ideal olmakla birlikte, bazı durumlarda farklı Mg⁺² miktarları gerekli olabilmektedir ⁵².

II. i. 6. Sıcaklık Döngüleri

PCR'ın üç değişik sıcaklıktan oluşan denatürasyon, primer birleşmesi ve polimerizasyon basamakları bir döngüyü oluşturur. Bu döngülerin tekrarlanması ile DNA çoğaltılır. PCR karışımlarını içeren tüpler otomatik programlanabilen cihazlarla (Thermal cycler) sıra ile bu sıcaklıklarda, istenilen sürelerde tutulur. Bütün DNA zincirleri 94 °C'de denatüre olduğu için hangi primer kullanılıyor olursa olsun ve hangi DNA çoğaltılırsa çoğaltılsın denatürasyon için genel olarak bu sıcaklık kullanılır. Primer birleşmesi için kullanılan sıcaklık, primerin nükleotid içeriğine göre değişir ve primerlerin ayrılma-bağlanma sıcaklıklarına göre belirlenir. Polimerizasyon sıcaklığı ise enzimin en iyi çalıştığı sıcaklıkta (Taq polimeraz için 72 °C'de) hep aynı tutulur. Bu sıcaklıklarda denatürasyon, primer birleşmesi ve polimerizasyon için gereken süre aslında birkaç saniyedir. Ancak cihaz içerisindeki tüplerdeki karışımların tamamının bu sıcaklıklara ulaşması biraz süre gerektirebilir. İnce çeperli tüplerin kullanılması bu sürelerin kısaltılmasını sağlayabilir. İnce çeperli tür kullanılan tipik bir PCR programı şu şekildedir; 94 °C'de 3 dakika denatürasyon sonrası 94 °C'de 30-45 saniye denatürasyon, primer bağlanma sıcaklığında (primere göre 50-70 °C arasında bir sıcaklıkta) 30-45 saniye primer birleşmesi ve çoğaltılan DNA'nın büyüklüğüne göre 45-60 saniye 72 °C'de polimerizasyon olmak üzere 35-45 döngü yapılır. En son 72 °C'de 3 dakika daha tutulması yarım kalan zincirlerin tamamlanmasını sağlar^{51,52,53}.

II. i. 7. Hedef

Tanısal PCR'ın özgüllüğü çoğaltım için uygun bir hedef dizisi seçilerek sağlanabilmektedir. Özgüllük, hedef dizi ve farklı cins veya türlerin DNA dizileri arasındaki homoloji derecesine bakılarak belirlenir. Örneğin; tüm mantarlarda ortak olan bir genin fazlaca korunmuş olan bir bölgesinin PCR protokolünde hedef dizi olarak seçilmesi bir enfeksiyonun

bakteriyal veya mantar kaynaklı olduğunu göstermek için uygundur. Bu strateji birçok araştırmacı tarafından, çoğaltım için hedef dizi olarak fungal ribozomal RNA (rRNA) içindeki oldukça korunmuş bölgeler veya universal bölgeler seçilerek uygulanmıştır. rRNA genleri oldukça korunmuş bölgeler içerdikleri için ve tüm DNA'ların çoğaltılmasında kullanılabildiğinden ayrıca birbirine yakın türlerin identifikasyonunda kullanılabilen oldukça değişken bölgelere sahip olduklarından en fazla tercih edilen hedef genlerdir. rRNA genlerinin diğer bir avantajı da PCR duyarlılığını arttıran yüksek kopya sayısı göstermeleridir. Alternatif olarak özel cins veya türleri saptamak için bir genin oldukça değişken bir bölgesi daha yüksek bir özgüllük sağlayabildiğinden tercih edilmektedir. Bu amaçla rRNA genlerinin yanında mantar DNA genleri de hedef olarak seçilmiştir.

Fungal genotiplendirme çalışmalarında değişik gen bölgeleri hedef olarak kullanılmaktadır. Bu bölgeler kitin sentaz ve beta-tubulin gibi protein kodlayan intron bölgeleri olabilecekleri gibi, rDNA gibi protein kodlamayan genler de olabilir. Ribozomal DNA gen bölgesinin seçilme sebepleri arasında; çoklu tekrar sayısı, bazı bölgelerinin çok iyi korunmuş, bazı bölgelerinin ise aşırı değişken oluşu sayılabilir. Fungal nükleer ribozomal DNA (rDNA), internal transcribed spacer (ITS) olarak adlandırılan bölgelerde ayrılan üç genden oluşur [Geniş subünit gen (25S), küçük subünit gen (18S) ve 5.8 gen]. ITS bölgesi fungal tanıda özellikle önemli olan bir alandır. Bu alanlar iyi korunmuş, yüksek çeşitlilik gösterir ve fungal türlerin tanınmasında spesifik PCR primerlerinin geliştirilmesinde ideal bir başlatıcıdır^{53,54}.

Günümüzde PCR; adli tıp, kalıtsal hastalıkların belirlenmesi, patojen mikroorganizmaların saptanması, prenatal tanı, DNA dizi analizi, bilinmeyen dizilerin tayini, polimorfizmlerin saptanması, fosil DNA'sının incelenmesi ve rekombinant DNA teknolojisi gibi çeşitli alanlarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

II. j. RT-PCR (Revers Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

PCR işlemi yalnız DNA üzerinde uygulanabilmektedir, bu sebeple RNA içeren mikroorganizmalara ait genetik materyalin PCR ile tespiti istendiğinde öncelikle RNA'nın DNA'ya çevrilmesi gerekmektedir, bu amaçla RNA, PCR çalışmasından önce 'revers transcriptase' (RNA bağımlı DNA polimeraz) enziminin yardımı ile tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) çevrilerek bilinen PCR prosedürüne devam edilmekte ve bu teknik de 'Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction' (RT-PCR) olarak adlandırılmaktadır. RT-PCR, RNA hedeflerinin amplifikasyonu (çoğaltma) için geliştirilmiştir. RT-PCR, mRNA ve viral RNA gibi RNA hedef dizilerinin amplifikasyonu amacıyla kullanılır. Bu işlemde, RNA hedefleri önce 'reverse transcriptase' (RT) ile cDNA'ya çevrilmekte ve daha sonra PCR ile amplifiye edilmektedir. Konvansiyonel RT, PCR'daki yüksek ısıları tolere edemez, bu da primer bağlanmasının özgüllüğünü sınırlandırabilir. *Thermus thermophilus*'dan elde edilen ısıya dayanıklı DNA polimeraz ve bunun diğer organizmalardan elde edilen kuzenleri etkin revers transkripsiyon aktivitesine sahiptir. Bu enzimler ayrı bir RT adımına gerek duyulmadan RNA hedeflerinin amplifikasyonlarında kullanılabilir. Böylece RT ürünlerinin ayrı bir PCR tüpüne transferinin yorucu, zaman alan ve kontaminasyona açık işlemlerinden kaçınılmış olunur. Reaksiyon ısısının yüksekliği primer hibridizasyonundaki sıklığı artırır ve primer bağlanması, uzaması veya her ikisini de engelleyebilecek olan RNA ikincil yapısının oluşmasını önler⁵².

Bu çalışma, deneysel olarak kandidemi oluşturulmuş sıçanlarda; hedef organ olan böbrek dokusunda infeksiyonla birlikte salınan bazı sitokinlerin (TNF- α , IFN- γ , IL-10) gen ifadelerinin, RT-PCR yöntemi kullanılarak gösterilmesi için tasarlanmış ve bu şekilde *C. albicans* infeksiyonu sırasında oluşan sitokin profillerindeki değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

III. GEREÇ VE YÖNTEM

III. a. Gereçler

III. a. 1. Cihazlar

Thermal Cyclers (Apollo Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

Kuru Isı Bloğu (Boeco, Almanya)

Mikrosantrifüj (Heraeus, Almanya)

Santrifüj Cihazı (Hermle Z380, BioTek, Almanya)

Derin Dondurucu (Uğur, Türkiye)

UV Transluminatör (Syngene, İngiltere)

Etüv (Electro-mag, Türkiye)

Elektroforez Cihazı (Wealtec, Tayvan)

Hassas Terazı (Shimadzu, Japonya)

Su Banyosu (Techne, Amerika)

Otoklav (Sanyo, Japonya)

Pastör Fırını (Electro-mag, Türkiye)

Spektrofotometre (Roche, Amerika)

Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (Apollo Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

Işık Mikroskobu ve Dijital Fotoğraf Makinesi CX31 (Olympus, Japonya)

Ependorf (RNaz' dan Yoksun) (Trefflab, İsviçre)

Mikropipetler ve uçları (Beta Pette™, Amerika)

Makas (Dizdarer, Ankara)

Pens (Dizdarer, Ankara)

Penset (Dizdarer, Ankara)

III. a. 2. Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar ise şunlardır:

Digestion Buffer (Roche, Amerika)

Proteinaz K (Roche, Amerika)

High Pure RNA Isolation Kiti (Roche, Amerika)

Primerler (Biotec, Tayland)

dNTP (Bioron, Almanya)

Magnezyum (Bioron, Almanya)

Tampon (5X, 10X) (Bioron, Almanya)

Taq Polimeraz (Bioron, Almanya)

Enjektabl Su (Drogsan, Türkiye)

Agaroz (Onbio, Kanada)

TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) (1X)

Trisma Base (Sigma, Almanya)

EDTA (Fluka Biochemika, İsviçre)

Borik Asit (Sigma, Almanya)

Ethidium Bromür (Sigma, Almanya)

Orange G (Sigma, Almanya)

Etil Alkol (Riedel-de Haen, Almanya)

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (% 3) (Applichem, Almanya)
KOH (% 120) (Sigma, Almanya)
Celite 545 (Merck, Almanya)
NaNO₂ (% 5) (Applichem, Almanya)
KHSO₄ (% 5) (Sigma, Almanya)
Amonyum Sülfat (% 12,5) (Applichem, Almanya)
3-Metil-2-Tiazolon Hidrazon HCl Monohidrat (Biochrom KG, Almanya)
FeCl₃-6H₂O (% 0,83) (Applichem, Almanya)
Glukozamin (10 g/ml) (Sigma, Almanya).
Saboroud Dextrose Agar (SDA) (Oxoid, İngiltere)
Tripan Mavisi (Applichem, Almanya)
Gentamisin (İ.E. Ulagay, Türkiye)
Ampisilin (Mustafa Nevzat, Türkiye)
5-Fluorourasil (Biosyn, Almanya)
Heliosis Ekstraksiyon Modülü (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

III. a. 3. Diğerleri

Canlı gereçlerse şunlardır:

- *Wistar albino* sıçan, 200-250 gr, dişi (Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi)
- *Candida albicans* ATCC 10231 referans suşu

III. b. Yöntemler

III. b. 1. Suşlar

Çalışmada *C. albicans* ATCC 10231 referans suşu kullanılmıştır. *C. albicans* suşu, -30 °C'deki stok kültürden SDA plağına yapılan canlandırma ekiminin, 35 °C'de 48 saat inkübe edilmesi ile elde edilmiştir. Kültür sonrası Tripan mavisini ile *C. albicans* hücrelerinin canlılığı incelenmiş ve Thoma lamında sayılarak % 0,9 NaCl içinde 10^6 *Candida*/ml olacak şekilde Mc Farland standardına göre ayarlanmıştır.

III. b. 2. Hayvan Modeli

Deney koşulları, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde, Etik Kurul Yönergesine uygun şekilde tamamlanmıştır. Deney hayvanı olarak dört haftalık, 200-250 gr ağırlığındaki 22 adet (10 kontrol + 12 infekte) *Wistar albino* cinsi dişi sıçan kullanılmıştır. Infekte grup olarak seçilen 12 adet sıçanda nötropeni oluşumu için 5-fluorourasil (200mg/kg) intraperitoneal; bakteriyel enfeksiyonları engellemek için gentamisin (6 mg/kg) ile ampicilin (10 mg/kg) intramüsküler uygulanmıştır. Sıçanlara nötropheninin 5. gününde, içerisinde ml'de 1×10^6 *C. albicans* hücresi bulunan maya süspansiyonu lateral kuyruk veni aracılığı ile verilmiştir. 7 günlük enfeksiyon süresinin ardından sıçanlara ketamin (100 mg/kg) ile anestezi uygulanmıştır. Anestezi altında sıçanların abdomenleri % 70'lik etil alkol ile silindikten sonra steril makas ve penset yardımı ile açılmıştır. Kalpten kan alımı sırasında hayvanlar feda edilmiştir. Böbrekleri alınarak deneylerde kullanılıncaya kadar -70 °C'de saklanmıştır. Kontrol grubu olarak seçilen 10 sıçanın böbrek dokuları da aynı şekilde alınarak deneylerde kullanılıncaya kadar -70 °C'de saklanmıştır.

III. b. 3. Kandideminin Doğrulanması

Kandideminin doğrulanması için; kültür, *Candida* PCR ve dokuda kitin miktar ölçümü yapılmıştır.

III. b. 3. 1. Kültür

İnfekte sıçanlardan alınan böbrek dokusu örnekleri, çalışmadan önce -70°C'den alınarak inkübe edilmiştir.

III. b. 3. 2. *Candida* PCR

III. b. 3. 2. a. DNA'nın Eldesi Yöntemi

Böbrek dokusunda yer alan mantarlara ait DNA, Heliosis Ekstraksiyon Modülü (Metis Biyoteknoloji, Türkiye) kullanılarak elde edilmiştir.

1- Yaklaşık 100 µl'lik örnekler üzerine 400 µl DNA lizis bağlama solüsyonundan eklenmiş ve vortekslenmiştir.

2- Karışım 65 °C'de 10 dakika, +4 °C'de 2 dakika bekletilmiştir.

3- Spin santrifüj yapıldıktan sonra 50 µl DNA çöktürme solüsyonu eklenmiş ve vortekslenmiştir.

4- On beş dakika 13000x rpm'de santrifüj edilmiştir.

5- Üst kısım çökeleğe dokunmadan pipetle tamamen alındıktan sonra 500 µl DNA yıkama solüsyonu eklenmiş ve vortekslenmiştir.

6- Beş dakika 13000x rpm'de santrifüj edilmiştir.

7- Üst kısım pipetle tamamen alınmış ve tüpler 10 dakika oda sıcaklığında kurutulmuştur.

8- Yirmi µl DNA dilüsyon solüsyonundan konulmuş, vortekslenip spin santrifüj edilmiştir.

9- Tüm DNA örnekleri çoğaltma işlemine kadar -20 °C'de bekletilmiştir.

III. b. 3. 2. b. DNA Varlığının Doğrulanması

Böbrek dokularındaki DNA varlığının kontrolü (house keeping gen) Beta (β)-aktin geni pozitifliği ile gösterilmiştir. β-aktin geninin çoğaltılması için uygulanan PCR basamakları; 94 °C'de 3 dk., 35 döngü olmak üzere 94 °C'de 30 sn., 57 °C'de 45 sn., 72 °C'de 60 sn. ve son olarak 72 °C'de 5 dk. olarak düzenlenmiştir. Oluşan ürünler, % 2'lik agaroz jelde, UV ışığı altında görüntülenmiştir.

Tablo 1: β-aktin Geni Primerleri

β-aktin (F)	5'- TGG AGA AGA GCT ATG AGC TGC CTG - 3'
β-aktin (R)	5'- GTG CCA CCA GAC AGC ACT GTG TTG - 3'

III. b. 3. 2. c. *Candida* PCR

C. albicans ile infeksiyonun varlığını göstermek amacıyla panfungal PCR ve kitin ölçümü yapılmıştır.

III. b. 3. 2. d. Fungal DNA'nın Dokuda Gösterilmesi

Böbrek dokularında *C. albicans*'a ait DNA varlığını doğrulamak amacıyla panfungal PCR yapılmıştır. Böbreklerde, mantarlara özgül primerler (ITS 1 ve ITS 4) kullanılarak infeksiyon varlığı doğrulanmıştır. Bu aşamaya ait kullanılan primerler tablo 2'de gösterilmiştir. 5S rRNA bölgesinin çoğaltılması için uygulanan PCR basamakları; 94 °C'de 3 dk., 35 döngü olmak üzere 94 °C'de 30 sn., 57 °C'de 45 sn., 72 °C'de 60 sn. ve son olarak 72 °C'de 5 dk. olarak düzenlenmiştir. Oluşan ürünler, % 2'lik agaroz jelde, UV ışığı altında görüntülenmiştir.

Tablo 2: Fungal DNA Gösteriminde Kullanılan Primerler

ITS 1 (F)	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'
ITS 4 (R)	5'-TCC TCC GGT TAT TGA TAT GC-3'

III. b. 3. 3. Kitin Ölçümü

Dokuda mantarların varlığının doğrulanması için, hücre duvar elemanı olan kitin, sayısal olarak ölçülmüştür. Bunun için; kitin, yüksek ısıda KOH içinde kitosana dönüştürülmüş ve yüksek alkali ortamda spektrofotometrik olarak ölçülebilecek bir renk değişikliği oluşturulmuştur.

Böbrek homojenatları 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Çökelekler % 3'lük sodyum dodesil sülfat (SDS) içinde tekrar süspanse edilip 100 °C'de 15 dakika tutulmuştur. 10000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilen örneklerin çökelekleri distile su ile yıkanmıştır. Örnekler % 120'lik KOH çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra 130 °C'de 60 dakika bekletilmiştir. Soğuduktan sonra üzerlerine buzda soğutulmuş % 75'lik etanol ilave

edilmiştir. Tüpler 15 dakika süre ile buzda bekletilip ardından Celite 545 ilave edilmiştir. 10000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilen örneklerin çökelekleri yıkanıp % 5'lik NaNO_2 + % 5'lik KHSO_4 karışımından oluşan çözelti ile karıştırılmıştır. Örnekler 15 dakika boyunca iyice karıştırılıp, daha sonra santrifüj edilmiştir. Üst sıvı % 12,5'lik amonyum sülfat ve 3-metil-2-tiazolon hidrazon HCl monohidrat karışımı ile karıştırılarak 100 °C'de 3 dakika bekletilmiştir. Soğuduktan sonra % 0,83 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi eklenerek 25 dakika beklenmiştir. Son ürün 650 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutulmuştur. Elde edilen optik dansite (OD) değerleri 10 ng/ml glukozamin OD'si standart olarak karşılaştırılmıştır.

III. b. 3. 4. Dokulardan mRNA Eldesi

Bulaşmış genomik DNA'nın amplifikasyonundan kaçınmak için tüm örnekler 15 dk. boyunca deoksiribonükleazda bekletilmiştir. Böbrek dokusundaki mantarlara ait RNA, Heliosis Ekstraksiyon Modülü (Metis Biyoteknoloji, Türkiye) kullanılarak elde edilmiştir.

1- Yaklaşık 100 µl'lik örnekler üzerine 400 µl RNA lizis bağlama solüsyonundan eklenmiş ve vortekslenmiştir.

2- Karışım 65 °C'de 10 dakika, +4 °C'de 2 dakika bekletilmiştir.

3- Spin santrifüj yapıldıktan sonra 50 µl RNA çöktürme solüsyonu eklenmiş ve vortekslenmiştir.

4- On beş dakika 13000x rpm'de santrifüj edilmiştir.

5- Üst kısım çökeleğe dokunmadan pipetle tamamen alındıktan sonra 500 µl RNA yıkama solüsyonu eklenmiş ve vortekslenmiştir.

6- Beş dakika 13000x rpm'de santrifüj edilmiştir.

7- Üst kısım pipetle tamamen alınmış ve tüpler 10 dakika oda sıcaklığında kurutulmuştur.

8- Yirmi µl RNA dilüsyon solüsyonundan konulmuş, vortekslenip spin santrifüj edilmiştir.

9- Tüm RNA örnekleri çoğaltma işlemine kadar -20 °C'de bekletilmiştir.

III. b. 5. Sitokin (IFN-γ, TNF-α, IL-10) PCR

Böbrek dokusunda sitokin ifadenmesi RT-PCR ile araştırılmıştır. RT-PCR ile çalışılacak sitokinelere ait primerler tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3: Sitokin RT-PCR Çalışmasında Kullanılan Primerler

Sitokin	Primer Diziler
TNF-α (F)	5'-CCT CAG CCT CTT CTC ATT CC-3'
TNF-α (R)	5'-CTC CGT GAT GTC TAA GTA CTT GG-3'
IL-10 (F)	5'-CAG TCA GCC AGA CCC ACA T-3'
IL-10 (R)	5'-GCT CCA ATG CCT TGC TTT-3'
IFN-γ (F)	5'-CAC GCC GCG TCT TGG T-3'
IFN-γ (R)	5'-TCT AGG CTT TCA ATG AGT GTG CC-3'

III. b. 5. a. RT-PCR

Reverse transcription-PCR analizi için; total RNA, üreticinin (Metis Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye) önerileri doğrultusunda Heliosis RNA isolation kit ile izole edilmiştir. Total RNA'nın 1 ng'ı cDNA sentezlemek için kullanılmıştır. Revers transkripsiyon 95 °C'de 1 dakika, 50 °C'de 1 saat ve 4 °C'de 5 dakika örneklerin tutulmasıyla sağlanmıştır. PCR için kullanılan primerler Tablo 3'de gösterilmiştir. IL-10, IFN- γ ve TNF- α için PCR, yaklaşık 10 ng cDNA, içerisinde 20 pmol oligonükleotit primeri her bir 0,5 ml'lik ependorfa, her bir dATP, dTTP, dCTP ve dGTP'den 250 μ M, 3mM MgCl₂, 2,5 U Taq DNA polimeraz ve 10X tampon eklenerek total hacim 25 μ l olacak şekilde karışım hazırlanmıştır (Bütün kimyasallar Bioron, Almanya) (Tablo 4 ve Tablo 5). Amplifikasyon prosedürü; 95 °C'de 1 dakika, bunu izleyen 45 siklusta 95 °C'de 30 saniye, her bir primer için uygun olan bağlanma derecesinde 45 saniye ve 72 °C'de 60 saniye, finalde ise 72 °C'de 5 dakika thermal cycler'da (Apollo Metis, Türkiye) örneklerin tutulması esasına dayanmaktadır. Primerlerin bağlanma sıcaklıkları; IL-10 için 58 °C, IFN- γ için 50 °C, TNF- α primerleri için ise 58 °C'dir (Zeydanlı, Türkiye).

9 μ L PCR ürünü 3 μ L Orange-G ile karıştırılarak % 2'lik agaroz jelde, 1X'lik TBE tamponda, 90V'da yürütülmüştür. Jelde yürütüldükten sonra etidyum bromid ile boyanmıştır. UV transluminatörde bantlar görüntülenmiştir.

Tablo 4: PCR Reaksiyon Karışımı (1. Tur) (cDNA Eldesi İçin)

Reagent	Hacim (1 örnek için)	Konsantrasyon
PCR tamponu, 5X	5 µl	1X
MgCl ₂	3 µl	3 mM
dNTP	0,1 µl	250 µM
Primer 1	0,1 µl	20 pmol
Primer 2	0,1 µl	20 pmol
Revers Transkriptaz Enzimi	0,1 µl	2,5 U
Su	16,5 µl	-
Eksrakte DNA	3 µl	10 ng

Tablo 5: PCR Reaksiyon Karışımı (2.Tur) (cDNA Çoğaltılması İçin)

Reagent	Hacim (1 örnek için)	Konsantrasyon
PCR tamponu, 10X	2,5 µl	1X
MgCl ₂	2,5 µl	3 mM
dNTP	0,1 µl	250 µM
Primer 1	0,1 µl	20 pmol
Primer 2	0,1 µl	20 pmol
Taq Polimeraz	0,2 µl	2,5 U
Su	16,4 µl	—
cDNA	3 µl	10 ng

Tablo 6: cDNA oğaltılması İçin Yapılan PCR Sıcaklık Döngüleri

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1X	95 °C	1 dakika
45X	95 °C	30 saniye
	Primer için bağlanma sıcaklığı*	45 saniye
	72 °C	60 saniye
1X	72 °C	5 dakika

* IL-10 için 58 °C, IFN-γ için 50 °C, TNF-α primerleri için ise 58 °C'dir.

III. b. 4. Kontaminasyona Karşı Koruma

RNA ekstraksiyonu ve PCR steril koşullarda ve birbirinden farklı odalarda çalışılmıştır. Bütün deneyler için kullanılan su, nükleaz ve pirojenden yoksundur. Mikrosantrifüj tüpleri otoklavda ve UV'ye maruz bırakılarak steril edilmiştir. Nükleazdan yoksun PCR tüpleri (Costar, Corning, NY, USA) UV ışığında steril edilmiştir. Pipetler PCR'a uygun filtreli tipte kullanılmış, reaksiyonlar UV ışığı bulunan biyolojik yönden güvenli kabinde (Metis Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye) yapılmıştır. Negatif sonuçlar tekrarlayan RT-PCR prosedürleri ile doğrulanmıştır. Nükleazdan yoksun suyun bir negatif ve bir pozitif kontrol örneği bütün örneklerin çalışılmasında kullanılmıştır.

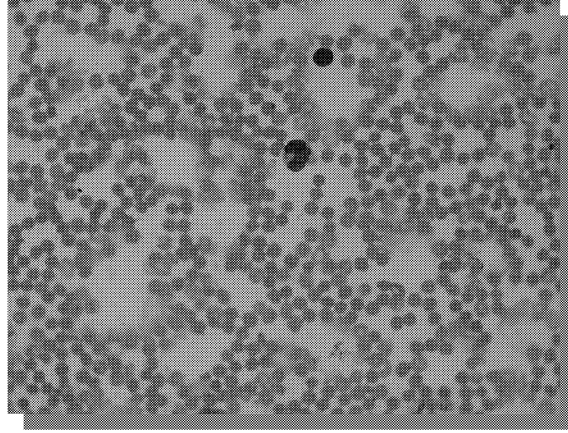
III. b. 5. İstatistiksel Analiz

Deneyisel sayılar ve yüzdeler kullanılarak, bağımsız gruplar için Fisher'in ki-kare testi, kitin ölçümlerinin analizinde kontrol ve infekte grup karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

IV. BULGULAR

IV. 1. Nötropenin Gösterilmesi

Hayvanlardan alınan kan örneklerinden yapılan periferik yayma preparatında, infekte grubun nötropenik olduğu görülmüştür (Şekil 8).

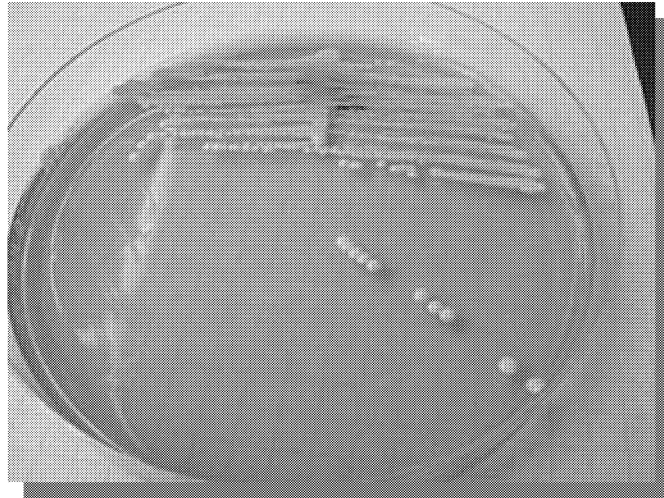


Şekil 8: Kandidemi Grubunun Periferik Yayma Preparatı
(Giemsa, x100)

IV. 2. Kandideminin Doğrulanması

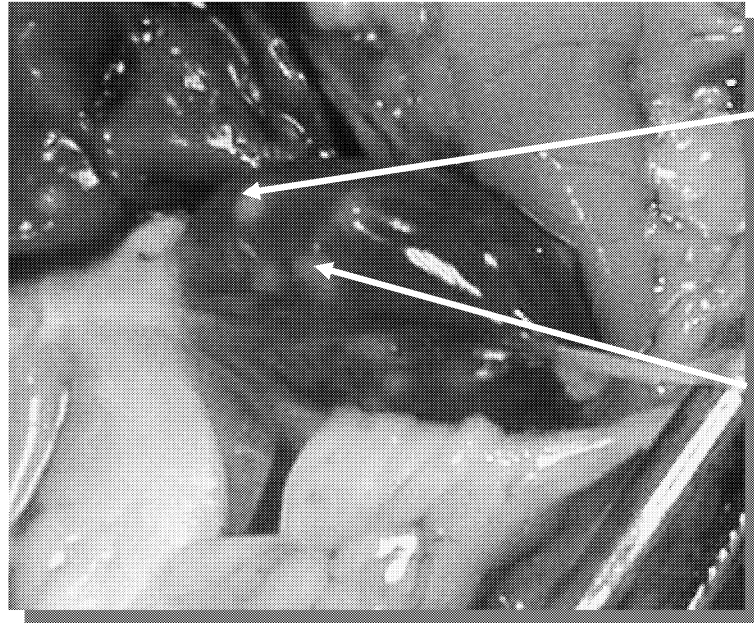
IV. 2. a. Kültür

İnfekte hayvan böbreğinden yapılan doku ekimlerinde 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonucu kültürlerde pozitiflik gözlemlenmiştir (Şekil 9).



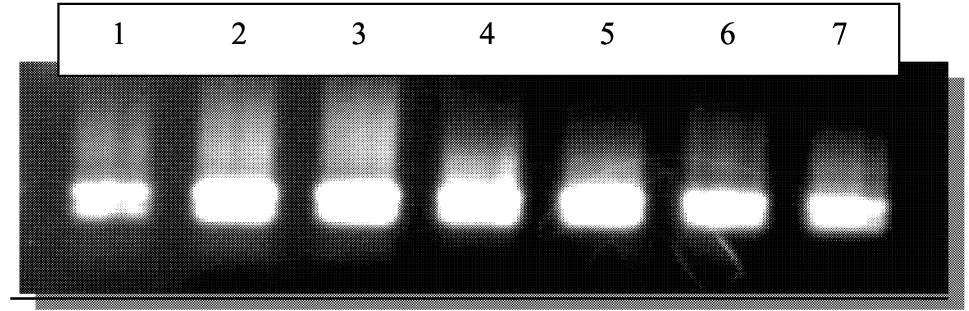
Şekil 9: SDA Agarda Üreyen *Candida* Hücreleri

Şekil 10: Böbrek Kandidozu Oluşturulmuş Deney Hayvanlarında Böbrekte Enfeksiyon Odakları

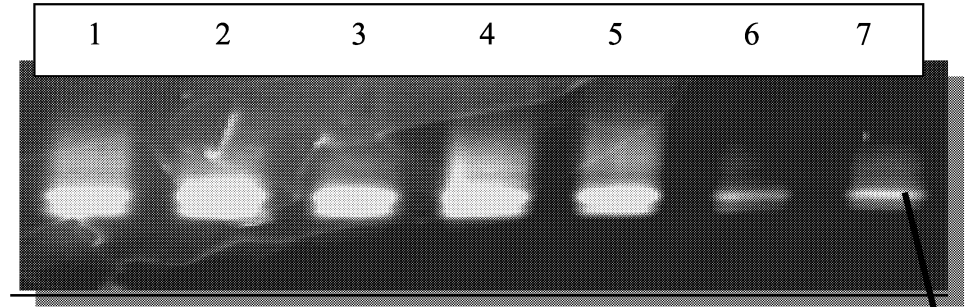


IV. 2. b. DNA Varlığının Doğrulanması

Böbrek dokularındaki DNA varlığı pozitifliğini göstermek amaçlı bakılan β -aktin kontrol ve infekte örneklerde pozitif olarak bulunmuştur. Şekil 11 ve 12’de bazı kontrol ve infekte sıçan böbrek dokusu örneklerine ait β -aktin primeri ile yapılan PCR sonuçları görülmektedir.



Şekil 11: Bazı Kontrol Grubu Örneklerinde β -aktin

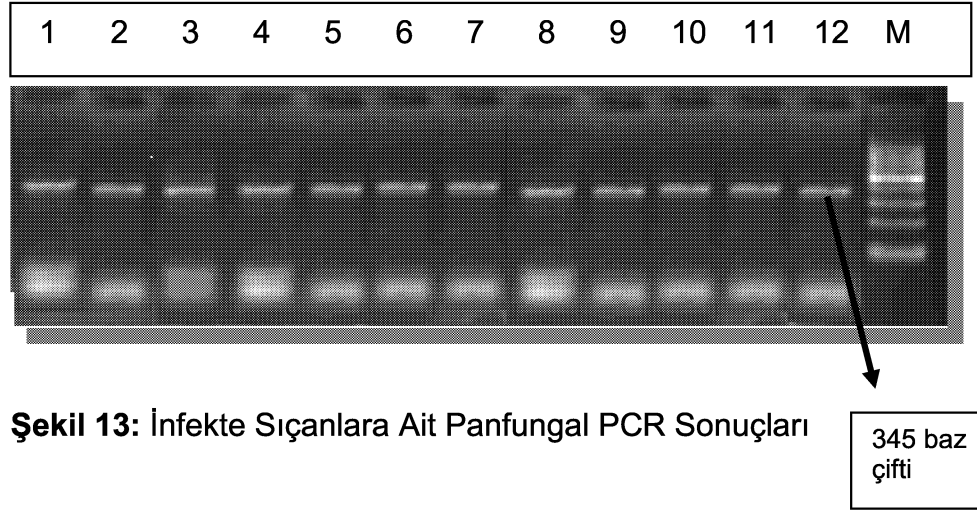


Şekil 12: İnfekte Grupta β -aktin

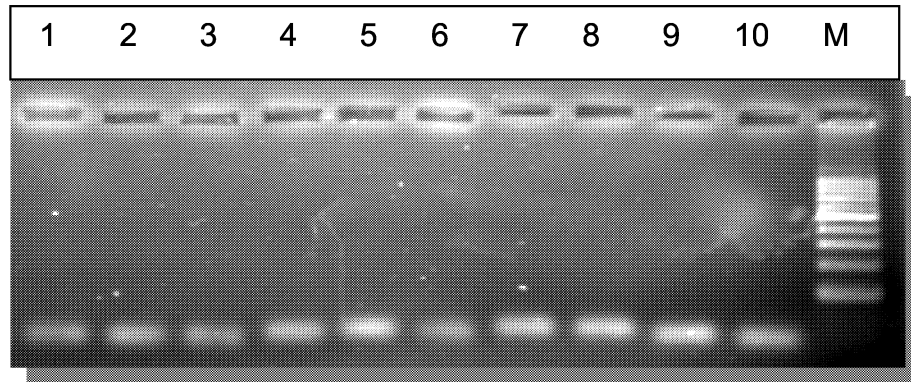
β -aktin
pozitifliği

IV. 2. c. Fungal DNA'nın Dokuda Gösterilmesi

Bütün dokulardan elde edilen DNA'lar fungal primerler ile çoğaltıldığında *Candida* ile infekte grubun tamamında pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Ürünler 345 baz çifti uzunluğundadır (Şekil 13). Kontrol grubunda, böbrek dokusunda fungal DNA görülmemiştir (Şekil 14).



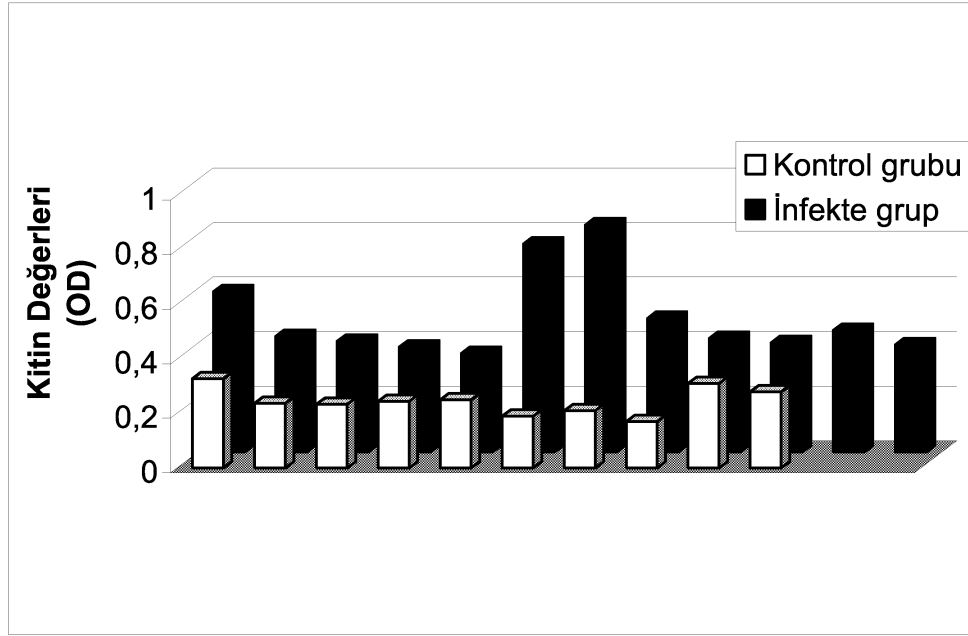
Şekil 13: İnfekte Sıçanlara Ait Panfungal PCR Sonuçları



Şekil 14: Kontrol Grubu Sıçanlara Ait Dokuda Panfungal PCR Sonuçları

IV. 2. ç. Kitin Ölçüm Sonuçları

İnfekte ve kontrol grubu farelere ait kitin ölçüm sonuçlarına ait grafik gösterilmiştir.



Grafik 1: Kontrol ve İnfekte Grupta Kitin Değerleri

Kitin ölçümü sonucu *C. albicans* ile infekte sıçan grubunda kitin ölçüm değerleri *C. albicans* ile infekte olmayan kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$).

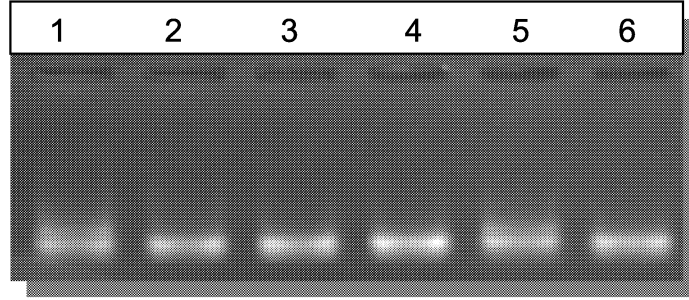
Tablo 7: Kitin Ölçüm Sonuçları

	Kontrol Grubu	Kandidoz Grubu
1. Örnek	0,328	0,588
2. Örnek	0,237	0,424
3. Örnek	0,233	0,406
4. Örnek	0,244	0,385
5. Örnek	0,250	0,362
6. Örnek	0,190	0,763
7. Örnek	0,210	0,833
8. Örnek	0,170	0,490
9. Örnek	0,310	0,417
10. Örnek	0,280	0,401
11. Örnek		0,446
12. Örnek		0,393

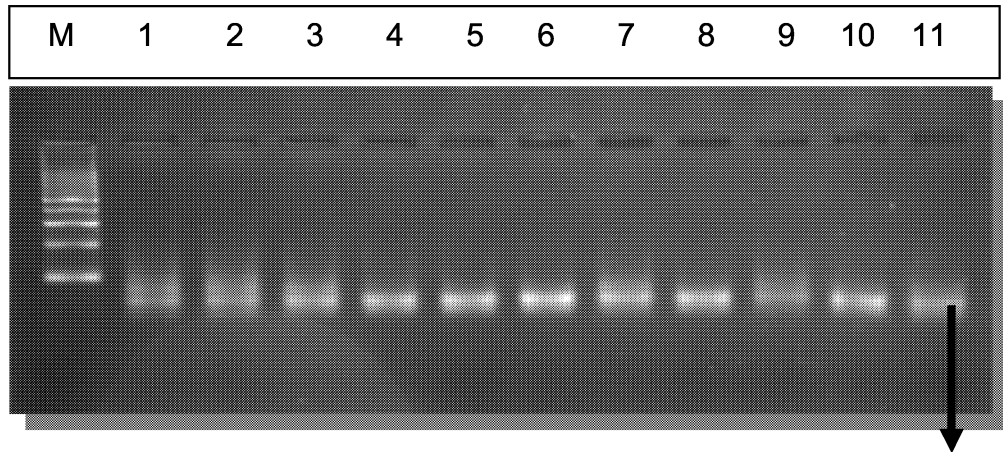
IV. 3. Sitokinlerin İfadelenmesinin RT-PCR Sonuçları

IV. 3. 1. TNF- α 'nın Gösterilmesi

Jel görüntülemesi sonucunda 10 kontrol grubundan 6'sında (6/10); 12 infekte dokunun 11'inde (11/12) TNF- α 'nın 105 baz çiftlik ürünü gösterilmiştir. *C. albicans* ile infekte grup ile infekte olmayan kontrol grubu arasında TNF- α ifadenmesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,135$) (Şekil 15 ve 16).



Şekil 15: Kontrol Grubu Örneklerinde TNF- α İfadelenmesi (1-6 Örnekler)

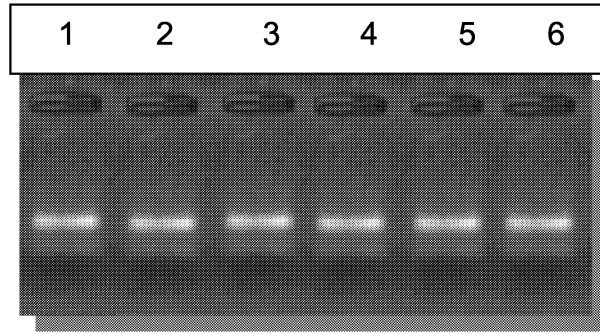


Şekil 16: İnfekte Böbrek Dokularında TNF- α İfadelenmesi

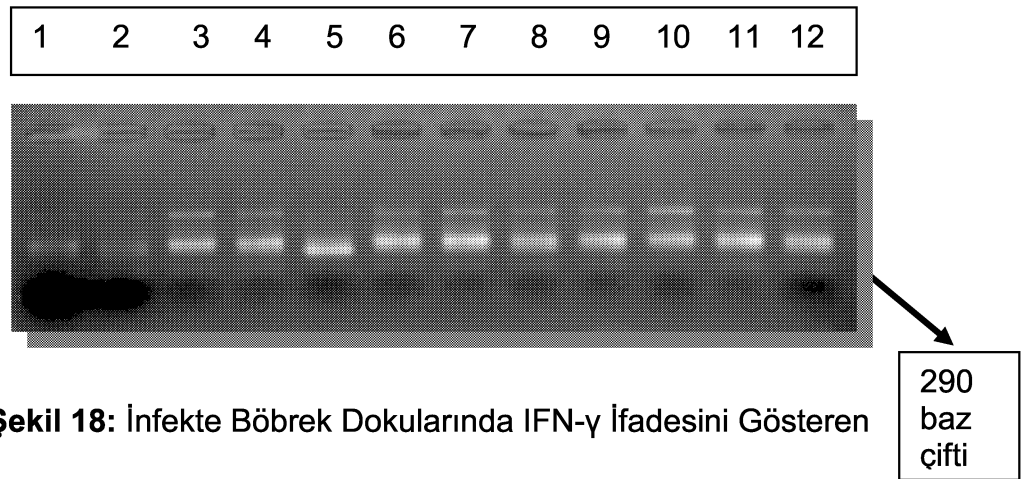
105
baz
çifti

IV. 3. 2. IFN- γ İfadesinin Gösterilmesi

Jel görüntülemesi sonucunda 10 kontrol grubundan 6'sı (6/10); 12 infekte dokunun 12'sinde (12/12) IFN- γ 'nın 290 baz çiftlik ürünü belirlenmiştir. *C. albicans* ile infekte grup ile infekte olmayan kontrol grubu arasında IFN- γ ifadelenmesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmiştir ($p=0,029$) (Şekil 17 ve 18).



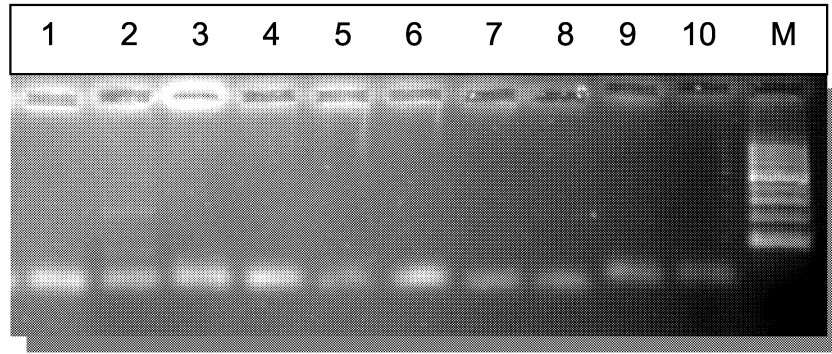
Şekil 17: Kontrol Grubu Örneklerinde IFN- γ İfadesini Gösteren Bantlar (1-6.Örnekler)



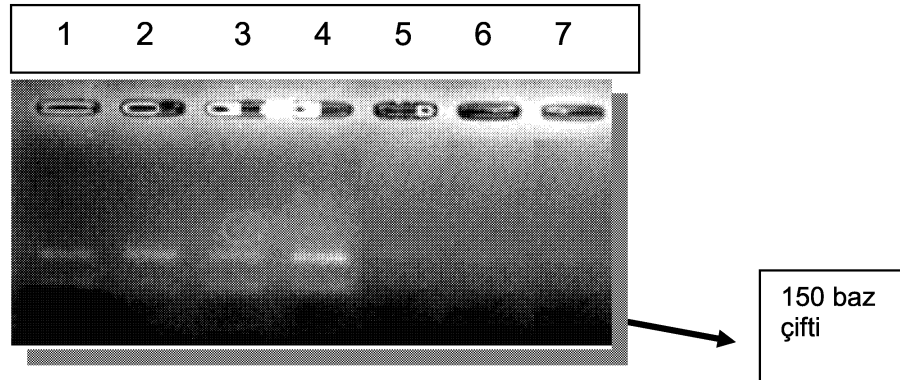
Şekil 18: İnfekte Böbrek Dokularında IFN- γ İfadesini Gösteren Bantlar

IV. 3. 3. IL-10 İfadesinin Gösterilmesi

Jel görüntülemesi sonucunda 10 kontrol grubundan 1'i (1/10); 12 infekte dokunun 9'unda (9/12) IL-10'un 150 baz çiftlik ürünü bulunmuştur. *C. albicans* ile infekte grup ile infekte olmayan kontrol grubu arasında IL-10 ifadenmesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmiştir ($p=0,004$) (Şekil 19 ve 20).



Şekil 19: Kontrol Grubu Örneklerinde IL-10 İfadesini Gösteren Bantlar



Şekil 20: Bazı İnfekte Grup Örneklerinde IL-10 İfadesini Gösteren Bantlar

Tablo 8: PCR ile Elde Edilen Sitokin İfadelenmesi Sonuçlarının Karşılaştırılması

	Kontrol (10)	Kandidemi (12)	p Değerleri
TNF-α n (%)	6 (60)	11 (91,6)	p=0,135
IFN-γ n (%)	6 (60)	12 (100)	p=0,029
IL-10 n (%)	1 (10)	9 (75)	p=0,004

V. TARTIŞMA

Son yıllarda tıbbi girişimlerin artışı çeşitli hasta gruplarının mantar infeksiyonlarına yatkınlığını arttırmıştır. Bağışıklık sistemi, organ transplantasyonu, antibiyotik kullanımı, AIDS gibi nedenlerle baskılanmış bireylerde mantar infeksiyonları ciddi sorunlar oluşturabilmektedir ⁴⁰. Hastane kaynaklı kandidemi yaklaşık olarak hastane kaynaklı infeksiyonların %10-15'ini oluşturur. Mantar infeksiyonları önemli hale gelmiştir ^{1,10,11}. Amerika Birleşik Devletleri'nde kandidoz insidansı 1980'lerde % 2 düzeyinde seyrederken 1990'da % 3,8'e yükselmiştir ⁵⁵.

Fungal infeksiyonların tanısı, tedavide izlenecek yolun belirlenmesi açısından kritik öneme sahiptir. Mantar infeksiyonlarının tanısı, klasik olarak kültürden etkenin izolasyonu ve tanımlanması, serolojik olarak mantar ürünlerinin gösterilmesi, histopatolojik preparatlarda mantarlara ait hiflerin veya hücrelerin görülmesi, radyolojik olarak özgül görüntülerin saptanması eşliğinde klinik bulgular ile konmaktadır ⁵⁶. Moleküler yöntemler, yüksek özgüllük ve duyarlılıkları ile son yıllarda bütün infeksiyon hastalıklarında olduğu gibi, mantar infeksiyonlarında da tanı koydurucu avantajlar sunmaktadır ⁵⁷. Özellikle kültürde üretilmeyen etkenlerin moleküler yöntemler kullanılarak gösterilmesi tanıda önemli avantajlar getirmiştir. Etken kültürde üretilse bile tür tanımı yapılması için moleküler yöntemlerden faydalanılabilir ⁵⁸.

Derin dokularda infeksiyon oluşturan mantarların kültürden izolasyonu genellikle % 50 başarı ile mümkün olmaktadır ⁵⁹. Bu nedenle mantar infeksiyonlarının tanısı; genellikle histopatolojik preparatlarda görülen nonspesifik mantar elemanları ve serolojik; radyolojik indirekt tanı yöntemlerinin desteklediği klinik tanıda kısıtlı kalmaktadır. Pek çok olguda tür, hatta cins tanımı yapılamamaktadır. Farklı etkenlerin neden olduğu

mantar infeksiyonları klinik veya radyolojik olarak birbirinden ayıramayabilir. Bu açıdan bakıldığında mantarların en azından cins düzeyinde tanımlanmaları gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Moleküler yöntemler diğer tanı yöntemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda, bu gerekliliğe cevap verebilecek geniş olanaklar sunmaktadır^{60,61}.

Çeşitli hasta gruplarında etken tanımlamada kullanılan panfungal PCR yönteminin tanıya yardımcı olduğu çalışmalarda bildirilmiştir. Burik ve ark. yaptıkları çalışmada, insan kan kültürlerinde panfungal PCR yöntemi ile türe özgü primerler kullanarak fungal DNA'lar elde edilip infeksiyon etkenleri gösterilmiştir⁶².

Kercher ve ark. eksizyon öncesi fungal endoftalmi şüphesi için yaptıkları çalışmada panfungal PCR yöntemi ile fungal DNA varlığını göstermişlerdir⁶³.

Beggs ve ark., oral kandidozda *C. albicans*'a ait genlerin farklılıklarını göstermek amacıyla RT-PCR yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada, DNA eldesini β -aktin geni ile göstermişlerdir⁶⁴. Benzer olarak Okeke ve ark. da kutanöz kandidozda DNA varlığını β -aktin ile belirlemişlerdir⁶⁵.

Fungal biyokütle ile uyumlu olan kitinin dokuda varlığının gösterilmesi, in vivo üremenin de bir işareti olarak kabul edilir. Kitin, sıcak alkali ortamda kitosana dönüşür. Kolorimetrik ölçümle kitosanın ölçülmesi sonucu mantarın sahip olduğu kitin de belirlenmektedir.

Hayashi ve ark.'nın nötropenik farelerde invaziv aspergilloza karşı antifungal ilaçların etkinliğini değerlendirdikleri bir çalışmada; antifungal ilaçların kullanımından sonra akciğerlerdeki kitin ve plazmadaki β -D glukoz düzeylerinin belirgin bir şekilde baskılandığı ancak mantarın "cfu" değerinin değişmediği gösterilmiştir. Araştırmacılar, cfu değerinin hifal büyümeyi yansıtmadığını ancak kitin düzeylerinin hifal büyüme ile orantı gösterdiğini bildirmişlerdir⁶⁶.

Balloy ve ark. ise kortikosteroid ve kemoterapötik bir ajanla bağışıklığın baskılanmasından sonra geliştirdikleri deneysel İPA (intra pulmoner aspergilloz) modelinde kitin ve galaktomannan konsantrasyonlarını kortikosteroid verilmiş hayvanlarda daha düşük bulmuşlardır. İnsanlarda gelişen aspergilloz infeksiyonundaki gibi kemoterapötik ajan verilmiş denekler *Aspergillus fumigatus*'a karşı daha fazla duyarlılık göstermişlerdir. Çünkü parçalı lökositlerin yokluğunda mantar akciğer dokusunu hızlıca invaze ettikten sonra diğer organlara da yayılabilmektedir. Bu çalışmada kitin ve galaktomannan düzeyleri *Aspergillus* için bir canlılık indeksi olarak değerlendirilmiştir⁶⁷.

Bizim çalışmamızda da, *C. albicans* ile infekte olan grupta, infekte olmayan kontrol grubuna göre kitin düzeyleri anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu farkın infekte grupta mantar DNA varlığını gösterdiği düşünülmektedir.

Fungal infeksiyonlara karşı savunmada kullanılan doğal, hücresel/humoral bağışıklık mekanizmalarının şekillenmesi, mantarın birtakım özelliklerinin yanı sıra konağın özellikleri ve infeksiyonun olduğu anatomik bölge ile ilgilidir. Mantarlara karşı bağışık yanıtta, konağın bağışıklık sistemi ile mantarın geliştirdiği birtakım bağışıklık sisteminden kaçış mekanizmaları arasında kıyasıya bir mücadele söz konusudur^{1,2}.

Candida'lara karşı gelişen bağışık yanıtın bütün ayrıntıları tam olarak açıklanmamış olmakla birlikte, doğal ve kazanılmış bağışıklık sisteminin birlikte bu savunmada rol aldığı bilinmektedir. Mantar infeksiyonlarında konağın bağışık durumunun çok önemli olduğunu vurgulamak gerekir. Çünkü son yıllarda mantar infeksiyonlarında görülen artışlar, özellikle bağışıklık sistemi çeşitli sebeplerle baskılanmış veya zayıflatılmış hastalarla uyumludur^{34,35}.

Doğal bağışıklık, infeksiyonun erken dönemlerinde gelişir ve ökaryotik organizmalara karşı korunmada etkindir. Çeşitli uyarılar aracılığı ile aktifleşen makrofajlar ve diğer bağışıklık sistemi üyeleri

“sitokin” olarak tanımlanan ve infeksiyon, travma, inflamasyona karşı konak yanıtını düzenleyen polipeptitler üretir. Doğal bağışıklık, sitokin ve kemokin gibi aracı moleküller kullanarak antijen tanınması ve sunumunu gerçekleştirir. Mikroorganizmalar vücuda girdiklerinde ilk olarak, anatomik ve fiziki bariyerler, normal flora ve savunma sistemleri (defensinler gibi) ile karşılaşır. Bu basamakları geçebilen mikroorganizmalar, fagositik hücreler ve antijen sunucu hücrelere maruz kalır; böylece doğal bağışıklık mekanizması tamamlanır^{2,3,10,11}.

Candida’lara karşı savunmada mononükleer ve PMNL gibi fagositer sistem hücreleri tarafından oluşturulan hücresel yanıt çok önemlidir. Bu hücreler oksidatif ve nonoksidatif mekanizmalarını kullanarak *Candida*’ların hücre içi ve hücre dışı ortamda öldürülmesine katkıda bulunur. Ayrıca makrofajlar, mikroorganizmayı işleyerek Th hücrelerine sunar ve kazanılmış bağışıklık yanıtının başlatılmasında rol oynar. Mononükleer hücreler salgıladıkları sitokinler aracılığı ile de bağışıklık sisteminin farklı basamaklarını etkiler. Nötrofil sayısında azalma ve nötrofil fonksiyonlarında bozukluk bulunan hastalarda *Candida* infeksiyonlarının sıklığında önemli bir artış görülmüştür^{1,10,11,35,36}.

Th1 yanıtı, IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α gibi sitokinlerin üretimi ile karakterizedir ve yeniden infeksiyonun oluşumuna karşı direnç sağlar. Th2 yanıtında, IL-4, IL-10, IL-6 üretimi görülür ve kronik hastalıkların gelişimi ile ilişkilidir. Th1 sitokinleri hücresel bağışık yanıtı, Th2 sitokinleri ise humoral bağışık yanıtı uyarır³⁶. Th1 ve Th2 sitokin profilleri analizleri, birçok hastalıktaki bağışık yanıtı belirlemede kullanılmaktadır^{35,36,68}. Th1 ve Th2 sitokinleri arasındaki kritik denge, koruyucu bağışıklığın oluşumunda gereklidir.

Th1 efektör hücreler, genellikle proinflamatuvar sitokinleri üretir. Proinflamatuvar sitokinlerin oluşumu, bağışık yanıtın erken dönemlerinde indüklenir. Böylece sitokinler mikrobiyal kolonizasyon ve invazyona karşı konak savunma mekanizmasına katkıda bulunmuş olur⁶⁹. Proinflamatuvar

sitokinler bu fonksiyonlarını yerine getirirken -dozlarıyla orantılı olmak üzere- ateş, inflamasyon, doku harabiyeti, şok ve ölüme de neden olabilirler. Proinflamatuvar sitokinlerin inflamasyon destekli aktiviteleri, IL-4, IL-10, IL-13 gibi antiinflamatuvar sitokinler tarafından baskılanır. Bu yüzden, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin etkileri arasındaki dengenin hastalığın sonlandırılmasına katkıda bulunduğu düşünülmüştür^{70,71,72}.

Kazanılmış immün sistem de *Candida*'lara karşı savunmada önemlidir. Özellikle Th1/Th2 mekanizmasında yer alan sitokinlerin bu savunmada çok kritik rol oynadığı bilinmektedir. Bu mekanizmanın savunmadaki rolü tam olarak açıklanırsa, *Candida*'lara karşı gelişen bağışık yanıtı anlamak çok daha kolay olacaktır. Antikorların rolü ile ilgili halen çok net bilgiler yoktur^{35,36,68,28}.

C. albicans, insanlarda fırsatçı fungal infeksiyonlara öncülük eder. *C. albicans* blastosporlarının intravenöz fareye verilmesi sonucunda maya yerleşimi böbrek, beyin ve kalpte görülür, tablo genellikle böbrek yetmezliğinden meydana gelen ölümle sonuçlanır^{68,72}. Fare sistemik kandidozunda Th1 yanıtının gelişiminin, fungal patojene karşı koruyucu bağışıklık ile ilgiliyken, Th2 yanıtının gelişimi patolojinin ilerleyişinin kanıtı olduğu düşünülmektedir^{34,68}.

Th1/Th2 sitokin dengesinin *Candida*'lara karşı savunmada oldukça önemli olduğu vurgulanmaktadır. Th1 sitokinlerin koruyucu rol oynadığı, bunun tersine Th2 grubu sitokinlerin *Candida*'ya karşı gelişen bağışık yanıtı bozduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür^{35,36,52}.

Yaptığımız çalışmada, *Candida* infeksiyonu sırasında görülen sitokin profillerindeki değişikliklerin belirlenmesi amacıyla, kandidoz oluşturulmuş sıçan modellerinde Th1 yanıtının göstergesi olarak TNF- α , IFN- γ ve Th2 yanıtının göstergesi olarak IL-10 gibi sitokinlerin ifadenmesi incelenmiştir. Elde edilen veriler sağlıklı kontrol grubu sıçanlarla karşılaştırılmıştır.

Daha önce yapılan çalışmaların çoğu, monosit/makrofajların *C. albicans* ile uyarıldığında sitokinleri salgılayıp salgılamadıkları veya hayvan deney modellerinde *C. albicans* infeksiyonlarında serumda sitokin düzeylerinin araştırılması üzerine yoğunlaşmıştır. Çalışmamız, infeksiyon odağı olarak böbrek dokusunda sitokin ifadenmesinin incelenmesi açısından diğer çalışmalardan farklı bir özellik sergilemektedir.

Çalışmamızda TNF- α ifadenmesi, 10 kontrol grubundan 6'sında (6/10); 12 infekte dokunun 11'inde (11/12) 105 baz çiftlik ürünü gözlenmiştir. TNF- α ifadenmesi açısından; *Candida* ile infekte sıçanlarda sayısal olarak bir fazlalık görülse de, *C. albicans* ile infekte grup ile infekte olmayan kontrol grubu arasında TNF- α ifadenmesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p=0,135$).

Steinshamn ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada normal ve granülositopenik farelerde oluşturulan *C. albicans* infeksiyonunda proinflamatuvar sitokin olan TNF- α ve bazı çalışmalarda proinflamatuvar bazılarında antiinflamatuvar sitokin olarak belirtilen IL-6 düzeyleri araştırılmıştır. Endojenez IL-6 literatürlerde, proinflamatuvar veya antiinflamatuvar sitokin olarak tam olarak tanımlanmaktadır ⁷³. Steinshamn'ın çalışmasında, granülositopenik farelerin serumlarında TNF- α ve IL-6 düzeylerinin normal farelere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak TNF- α düzeylerinin yüksek olması, *C. albicans* çoğalmasında bir azalma meydana getirmemiştir. Araştırmacılar çalışmalarında, TNF- α varlığının infekte grupta artış gösterdiğini belirlemiş olsalar da, TNF- α varlığının farelerdeki yaşam sürelerini etkilemediğini bildirmişlerdir. IL-6 düzeyinin ise *C. albicans* infeksiyonlarında arttığını, fakat mekanizmasının net olarak bilinmediği belirtilmiştir ⁷⁴.

Louie ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, *C. albicans* ile infekte farelerin serumlarında TNF- α miktarlarının giderek artış gösterdiği, infekte olmayan farelerde ise hiçbir artışın görülmediği bildirilmektedir. Aynı zamanda TNF- α 'nın varlığının organlardaki fungal yükü azaltarak konak

savunmasında olumlu katkıları olduğu bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar, TNF- α 'nın, periferik kandaki lökosit sayısını ve infekte dokulardaki inflamatuvar cevabı etkilemediğini bulmuşlardır. Aynı çalışma sırasında yapılan bir in vitro deneyde, TNF- α 'nın direk antikandidal etkisinin olmadığı gösterilmiştir ⁷⁵. Çalışmamızda infekte grupta TNF- α ifadenmesi kontrol grubuna göre sayısal olarak fazla olsa da, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

1998 yılında Mencacci ve ark. tarafından yapılan çalışmada TNF- α defekti olan farelerin sistemik ve sindirim sistemi infeksiyonlarına daha sık yakalandıkları, bu tür farelerin Th1 yanıtı ile ilişkili mantar infeksiyonlarından korunmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Bu durumun da kazanılmış ve doğal bağışıklık arasındaki eksiklikten kaynaklandığı söylenmektedir ³⁵.

Riipi ve ark. yaptıkları çalışmada, kandidoz oluşturulmuş farelerde TNF- α seviyesinin artış gösterdiğini ve *C. albicans*'ın neden olduğu akut faz proteinlerinden fibrinojenin artışında TNF- α 'nın rolü olduğunu bildirmişlerdir ⁷⁶.

Bazı proinflamatuvar sitokinlerin etkinliği ve akut infeksiyon anındaki değişimleri Gaforio ve ark. tarafından 2002'de gösterilmiştir. Kandidozdan 24 saat sonra ve LPS ile uyarım sonucunda TNF- α seviyelerinin kontrole oranla arttığını bildirmişlerdir ⁷⁷. Bizim çalışmamızda da TNF- α ifadenmesi sayısal olarak, infekte grupta daha fazla olarak bulunmuştur. Muhtemelen sıçan sayısının artırılması TNF- α ifadenmesi açısından infekte ve kontrol grup arasında istatistiksel bir fark yaratacaktır.

Kubota ve ark., sistemik kandidozdaki değişimlerden akut akciğer hasarından, alveolar makrofajlardan salınan TNF- α seviyesinde artışının neden olduğunu bildirmişlerdir ⁷⁸.

Benzer bir sonuç da Steele ve ark. tarafından yapılan deneylerde bildirilmiştir. Vajinal ve oral kandidoza karşı oluşan lokal bağışık yanıtta

TNF- α 'nın önemli olduğu gösterilmiştir ⁷⁹. Kalkancı'nın yaptığı tez çalışmasında da deney hayvanlarında değışik *Candida* türlerinin TNF- α düzeylerinde belirgin bir artışa neden olduğu belirlenmiştir ⁸⁰.

Bizim çalışmamızda TNF- α ifadelenmesinin kandidoz oluşturulmuş hayvanlarda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuç yukarıda belirtilen birçok çalışmanın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Yapılan çok sayıda in vivo ve in vitro çalışmalarda *C. albicans*'ın TNF- α salınımını uyardığı gösterilmiştir. Ancak TNF- α salınımının artması her zaman olumlu bir katkı anlamına gelmediği gibi in vivo şartlarda başka faktörlerin de devreye girdiği düşünülmektedir.

IFN- γ makrofaj aktive edici özelliği iyi bilinen bir sitokindir. Çalışmamızda; 10 kontrol grubundan 6'sı (6/10); 12 infekte dokunun 12'sinde (12/12) IFN- γ 'nın 290 baz çiftlik ürünü bulunmuştur. *C. albicans* ile infekte grup ile infekte olmayan kontrol grubu arasında IFN- γ ifadelenmesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmiştir (p=0,029).

Marodi ve arkadaşlarının yaptığı in vitro bir çalışmada monositlerden elde edilen makrofajların kandidasidal aktivitesinde IFN- γ 'nın rolü araştırılmıştır. Araştırmacılar, opsonize ve opsonize olmamış *C. albicans* kullanmış ve IFN- γ 'nın monosit/makrofajların kandidasidal aktivitesini artırıp artırmadığını incelemiş; sonuçta, IFN- γ 'nın bu hücrelerin kandidasidal aktivitesini opsonize veya opsonize olmamış durumda artırdığını göstermişlerdir. Zaman geçtikçe hücre kültüründe hem fagosite edilen *Candida* sayısının arttığı, hem de salınan sitokinin düzeylerinde artış görüldüğü belirlenmiştir ⁸¹.

Romani ve ark., IFN- γ 'nın Th1 yanıtını düzenleyen, Th2 yanıtını baskılayan pleomorfik bir sitokin olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca endotelial hücrelerin kandidal hasardan korunmasında IFN- γ 'nın rolü olduğu gösterilmiştir ^{70,82}.

İn vivo ve in vitro çalışmalar, IFN-γ'nın mantarları yok etme özelliği olan fagositleri aktive eden başlıca faktör olduğunu göstermektedir^{28,70}. Lavigne ve ark. da çalışmalarında IL-12 ve IFN-γ'nın ortaklaşa çalışarak doğal ve kazanılmış bağışık yanıt meydana getirdiklerini, IFN-γ'nın *Candida* infeksiyonuna dirençte rol oynadığını bildirmişlerdir⁸³.

Netea ve ark. tarafından, *Candida* ve mononükleer hücrelerinin in vitro olarak karşılaşmasında salgılanan IFN-γ seviyesinin; IL-12 ve IL-1β seviyelerini etkilediği, TNF-α salgılanmasından ise bağımsız olduğu bildirilmiştir. IFN-γ'nın invaziv kandidoza karşı savunmada önemli olduğu, granulositlerin kandidiyal aktivitesini artırdığı, makrofaj aktivasyonunu sağladığı ve sitotoksisiteye yardımcı olduğu bildirilmiştir⁸⁴.

Kaposzta ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, IFN-γ'nın invaziv kandidozda hayatta kalma şansını artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca bağışıklık sistemi defekti bulunan ve bulunmayan iki farklı fare grubunda, çeşitli doku ve organlardaki IFN-γ'nın yokluğu ile oluşan yetersiz lokal bağışık yanıtın, kandidozla daha da artabileceği gösterilmiştir⁸⁵.

Murciano ve ark., fagositik aktivitesi yüksek olan NK hücreler üzerindeki çalışmalarında, ölü *Candida*'nın NK hücresinden salınan IFN-γ üzerinde inhibe edici özelliği olduğunu bildirmiştir. Ayrıca kandidozda TLR sitokinlerinin önemli olduğunu ve TLR grubu sitokinlerin NK hücrelerinden salınan IFN-γ üretimini stimüle ettiğini göstermişlerdir³³.

Yaptığımız çalışmada da IFN-γ'nın kandidoz oluşturulmuş deney hayvanlarında kontrol grubuna oranla arttığını ve sonuçların da yukarıda bahsedilen çalışmalarla benzer olduğu belirlenmiştir.

Ancak bazı çalışmalarda bizim bulgularımızın tersine sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir.

Qian ve Cutler'in yaptığı bir in vivo çalışmada yaygın kandidoza karşı konak savunmasında IFN-γ'nın esansiyel olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu araştırmacılar, in vitro çalışmalarda bu rolün gösterildiğini,

ancak bu konuyla ilgili yapılan in vivo çalışmaların yetersiz olduğunu bildirmektedir. IFN- γ yönünden mutant fareler ile normal fareleri *C. albicans* ile infekte etmişler ve sonuçta fungal yük ve doku hasarı açısından bir fark bulamamışlardır. Sonuç olarak, IFN- γ 'nın *C. albicans*'a karşı gelişen konak savunmasında önemli olmadığını belirtmişlerdir⁸⁶.

IL-10 bakteriyel ve fungal infeksiyonlarında aşırı inflamasyonu önlemede ve antimikrobiyal savunmanın oluşumunda önemli olan antiinflamatuvar bir sitokindir. CD4 ve CD8 T lenfositleri, monosit, makrofaj ve B lenfositlerinden salınır. IL-10, T hücrelerini ve makrofaj fonksiyonlarını inhibe ederek bağışık ve inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde görev alır. IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1 β gibi sitokinleri, nitrik oksit üretimini inhibe ederek hücre sitotoksitesini durdurur^{35,68}. Roilides ve ark. mononükleer hücreler ile *Candida* hücrelerini in vitro olarak birleştirdiklerinde, mayaya karşı mononükleer hücreler tarafından oluşturulan antifungal etkinin IL-10 ile baskılandığını göstermiştir. Böylece vücuda giren antijenlere karşı geliştirilen antiinflamatuvar yanıtın düzenlendiğini bildirilmişlerdir^{87,88}.

Çalışmamızda, 10 kontrol grubundan 1'i (1/10); 12 infekte dokunun 9'unda (9/12) IL-10'un 150 baz çiftlik ürünü bulunmuştur. *C. albicans* ile infekte grup ile infekte olmayan kontrol grubu arasında IL-10 ifadenmesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmiştir ($p=0,004$). IL-10 ifadenmesinde infekte sıçan grubunda kontrol grubuna göre bu farkın belirlenmiş olması, infekte grupta Th2 yanıtının oluştuğu ve bu nedenle konakçının ilerleyici tarzda *Candida* infeksiyonuna maruz kaldığının göstergesi olduğu düşünülmektedir.

Kandidozla birlikte T hücreleri, IL-10 ve IL-4 salgılanmasına aracılık etmektedir. Tavares ve ark., *Candida* infeksiyonun ardından 2. saatte timusu çıkarılmış farelerde serumda bu sitokinlerin varlığını göstermişlerdir. Timus yönünden mutant olan farelerde ise, infeksiyonun ardından IL-10 seviyesinin azaldığını, IL-4'ün ise yok olduğunu tespit

etmişlerdir. Bu sonuçlara dayanarak timusu çıkarılmış farelerde kandidoza karşı dirençli olduğu, T hücrelerinin de bu dirençte rol alan ve infeksiyonun durdurulmasında görevli olan sitokinlerin salınmasını kontrol ettiğini belirlemişlerdir ⁸⁹.

Vazquez-Torres ve ark., IL-10 defekti bulunan farelerde akut sistemik kandidoza karşı bir direnç olduğunu, ancak IL-4 defekti bulunan farelerin kandidemiye daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir ⁹⁰.

Th1 ve Th2 yanıtı arasındaki etkileşimi gösteren karşılaştırmalı çalışmalardan birinde, Th1 yanıtı oluşturan IL-12'nin defektli olduğu kandidoz oluşturulmuş farelerde, *Candida*'ya karşı koruyucu özellik gösteren CD4+ Th1 hücrelerinin yetersiz kaldığı gösterilmiştir. Bu durum IL-12'nin Th1'e bağımlı bağışıklığın antifungal etkisinde önemli olduğu sonucunu düşündürmüştür. IFN- γ 'nın sistemik ve sindirim kanalı infeksiyonlarında azalmadığı, IL-12 salınımından bağımsız olduğu ve erken kandidozda etkin olduğu söylenmektedir. Mencacci ve ark.'nın yaptığı bu çalışmada, IL-10 ile IL-12'nin karşılıklı pozitif etkileşimlerinden de bahsedilmektedir. IL-12 defekti bulunan farelerde IL-10 salınımında azalma olduğu bildirilmiştir ³⁵.

Th hücreleri ve doğal bağışıklık sisteminin regülasyonunda önemli rolü olan IL-10 ve IL-12 gibi sitokinlerin seviyeleri normal koşullarda düşüktür. IL-6, IL-12 ve IFN- γ mRNA ifadenme seviyelerinin azalmasının IL-10 ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir ^{91,92}. Ayrıca IL-10'nun self-toleransta görevli T hücrelerinin salgılanmasını düzenlediği, IFN- γ ve TNF- α , IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinlerin seviyelerini baskıladığı gösterilmiştir. Bunlara ek olarak; IL-10'un, patojenlere olan bağışık yanıtın baskılanarak azaltılmasını sağladığı, böylece patojene karşı gelişen koruyucu bağışık yanıtı engellediği bildirilmiştir ^{92,93}.

Schaller ve ark. farelerde yaptıkları deneylerde, infekte olmayan hayvanlarda oral mukozada düşük seviyelerde IFN- γ , TNF- α , IL-6 ve IL-10 düzeyi beklerken; kandidozlu ve PMN eksikliği olan hayvanlarda IFN- γ ,

TNF- α , IL-6 seviyelerinde artış, IL-10 seviyesinde değişiklik olmadığını belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar tarafından, PMN ilavesi ile birlikte artan IFN- γ , TNF- α , azalan IL-10 seviyeleri belirlenmiştir ⁹⁴.

Brieland ve ark. ile Schaller ve ark.'nın deneylerinde *Candida* infeksiyonu ile birlikte çeşitli dokulardan salınan (ağız, vajina, böbrek) TNF- α , IFN- γ seviyesinin her geçen gün artarak devam ettiği, buna karşın antiinflamatuvar sitokinlerden IL-10'un azaldığı belirlenmiştir. İnfeksiyon tablosunun ilerleyen dönemlerinde ise Th2 grup sitokin ifadenmesi artış gösterirken, Th1 grubu sitokinlerde düşüş gözlenmiştir. TNF- α , IFN- γ , IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinlerin neden olduğu fagositik aktivite ile, *Candida* infeksiyonuna karşı konağın savunmasında anahtar rol aldıkları, IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin fagositik hücrelerin efektör mekanizmalarını baskılayarak infeksiyona karşı oluşturulan Th1 bağışık yanıtını ortadan kaldırdığı ve infeksiyona duyarlılığı artırdığı bildirilmiştir ^{94,95}.

Kronik mukokutanöz kandidoz, deri, tırnak ve/veya mukoz membranların ilerleyici ve tekrar eden *Candida* infeksiyonları ile karakterize kompleks bir bozukluktur. Kronik mukokutanöz kandidozlu (CMC) hastalarda yapılan çalışmalarda Lilic ve ark., IL-6 ve antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 seviyelerinin, bizim çalışmamızla uyumlu olarak arttığını, IL-12 ve IL-2 seviyesinin düştüğünü, TNF- α , IL-4 ve IL-5 seviyelerinde çok önemli bir değişimin görülmediğini ve ilginç olarak da IFN- γ 'nın neredeyse yok denecek kadar az olduğunu saptamışlardır. IL-12 ve IFN- γ 'nın da kandidozun vücuttan atılımı ve Th1 yanıtına yardımcı olduğu bilinmektedir. Mantarlara karşı koruyucu görev yapan Th1 yanıtının bu tür hastalarda bozuk olması, infeksiyonun ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. Ayrıca antiinflamatuvar sitokinlerin (IL-10 gibi) artışının, Th1 yanıtını baskılaması nedeniyle kandidoza karşı duyarlılığı arttığı bildirilmiştir. Bu hastalarda düşük düzey Th1 ve yüksek

düzy Th2 sitokin paterni mevcuttur ⁹⁷. Bu durum, bizim infeksiyon modelimizde elde ettiğimiz sonuçla uyum göstermektedir.

Netea ve ark., in vitro ve in vivo deneylerde, maya hücre duvarında bulunan mannan, glukon ve kitin gibi antijenik özellik taşıyan komponentlerin tanınmasında ve yok edilmesinde TLR2 ve TLR4'ün etkin bir şekilde rol oynadığını göstermişlerdir. Sitokin seviyelerine bakıldığında ise; TNF- α , IFN- γ gibi proinflatuvar sitokinlerin infeksiyonla arttığını, buna karşın IL-10 seviyesinin de azaldığı bildirmişlerdir ⁹⁸.

Bağışıklık sisteminde duyarlılık görülen yanık hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada, Th2 sitokinlerin varlığının yüksek olduğu gözlenmiş ve bu durumun daha çok hücre dışı patojenleri yok etmede görevli Th1 yanıtını baskıladığı, bunun sonucunda da *C. albicans* infeksiyonuna duyarlılığının arttığı bildirmişlerdir ⁹⁹.

Van der Graff ve ark., insan mononükleer hücreleri ile yaptıkları çalışmalarda artan *C. albicans* konsantrasyonları ile orantılı olarak TNF- α ve IFN- γ 'nın da arttığı, bu artışın hiflere oranla blastokonidyalarda daha fazla olduğu gösterilmiştir. Blastokonidyaların TLR2 ve TLR4 ile stimüle olduğu ve bu durumun IFN- γ 'nın salgılanmasını artırdığı; hiflerin ise TLR2 ile stimüle olduğu ve IFN- γ 'yı inhibe ettiği belirlenmiştir. TLR4'ün, *C. albicans* ile infekte hücrelerin blastokonidyalarında proinflatuvar sitokinlerin artışına neden olduğu, TLR2 ise hiflerde antiinflatuvar sitokinleri artırdığı bildirilmiştir. Bu durumun bağışık yanıtın dengelenmesinde kullanıldığı belirtmişlerdir ¹⁰⁰.

Th2 hücreleri, IL-4 ile uyarılırken, IFN- γ ile baskılanmaktadır ^{2,3,52}. Th2 yanıtının gelişimi *Candida* infeksiyonlarına duyarlılığı artırır. Çünkü bu grup sitokinler Th1 yanıtının gelişimini inhibe eder ve fagositik efektör hücrelerin aktivasyonunu engeller. Th2 yanıtının yüksek olması konakçının ilerleyici tarzda infeksiyona maruz kaldığının göstergesidir ^{28,34,36,52}. Ayrıca Th1 sitokin paterni patojenle temastan sonra laboratuvar hayvanlarının yaşamını sağlarken, Th2 hücrelerinin varlığı infeksiyonda

ölümcül bir seyre yol açar ¹⁰¹. 2002 yılında yayınlanan bir çalışmada, Piccinni ve ark., tekrarlayan vajinal kandidozlu hastaların periferik kan ve vajinal mukozadaki mononükleer hücrelerinin *C. albicans* antijenlerine karşı gelişen yanıtlarını in vitro olarak incelemiş; sonuçta tekrarlayan vajinal kandidozlu kadınlarda sağlıklı kontrol grubuna oranla yüksek IFN- γ ve düşük seviyelerdeki IL-4 seviyeleri görülmüştür. Bunlara dayanarak vajinal kandidozda daha baskın Th1 yanıtı, daha düşük düzeyde Th2 yanıtının olduğu belirlenmiştir ¹⁰².

Elahi ve ark. tarafından, *Candida* infeksiyonlarına duyarlı ve dirençli iki farklı fare modelinde yapılan çalışmada, infeksiyona dirençli grupta IL-4, IL-12 ve IFN- γ düzeylerinde, *C. albicans*'ın hızlı eliminasyonu ile uyumlu olarak erken dönemde artış olduğu;duyarlı grupta ise IL-4 ifadenmesinin geciktiği ve daha az olduğu belirlenmiş ve *C. albicans*'ın hızlı eliminasyonunun IFN- γ , IL-4 gibi sitokinlerin erken sekresyonunu sağladığı bildirilmiştir ¹⁰³.

Mullick ve ark.'nın yaptığı ve bizim çalışmamızın sonuçlarıyla örtüşen çalışmada araştırmacılar, infeksiyona duyarlılıkları farklı olan farelerde oluşturdukları infeksiyon modellerinde *C. albicans* infeksiyonu ile birlikte oluşan farklılıkları belirlemeye çalışılmışlardır. İnfeksiyona duyarlı olan grupta; IFN- γ , TNF- α ve IL-10 seviyelerinin dirençli gruba oranla belirgin olarak yüksek olduğunu tespit etmiş ve C5 komponenti eksik olan, infeksiyona duyarlı farelerdeki kandidoz sonrası homeostatik metabolik yolların yetersiz kaldığını ve sonucunda da kalp yetmezliği gibi önemli rahatsızlıkların geliştiği bildirilmiştir ³¹.

Bu çalışmalarda belirtildiği gibi, infeksiyonlar sırasında Th1 yanıtı ile Th2 yanıtı arasında karşılıklı bir etkileşim mevcuttur. Th1 yanıtı infeksiyonun erken dönemleri ile artış gösterirken, Th2 yanıtının oluşması ile birlikte Th1 yanıtı baskılanmaktadır ³⁶. Bizim çalışmamızda da IL-10 ifadenmesi artışına bağlı olarak Th2 yanıtı ve IFN- γ ifadenmesine bağlı olarak Th1 yanıtı gözlenmiştir. Ancak diğer bir Th1 sitokini olan TNF- α

ifadelenmesi infekte ve kontrol grubu arasında fark oluşturmamıştır. Bu verilerin muhtemelen hayvanların infeksiyonun ileri dönemlerinde (7. gün) öldürülmesine bağlı olduğu, aslında infeksiyonun erken dönemlerinde Th1 yanıtın olduğu ve hayvanın savunma mekanizmalarında yetersizliğe bağlı olarak bu yanıtın yavaş yavaş baskılanıp, Th2 yanıtının etkin hale geldiği düşünülmektedir. Dolayısıyla çalışmamızda, *Candida* infeksiyonu sırasında Th1 ve Th2 sitokin profilinde bir dengesizlik görüldüğü, bunun da infeksiyona karşı konağın oluşturmaya çalıştığı bağışık yanıtta önemli olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızın verilerine göre, Th2 yanıtının Th1 yanıtını baskılayarak *Candida* infeksiyonuna karşı korunmada negatif bir etki oluşturabileceği de düşünülmektedir.

VI. SONUÇ

Candida ve bağışıklık sisteminin diğer elemanları arasındaki ilişkinin çok karmaşık olduğu düşünülmektedir. Bu ilişkide tek bir parametrenin rolü yoktur. Çok sayıda bileşen birbiriyle etkileşim halinde görev yapmaktadır. Sitokinler de bu enfeksiyonda etkin rol oynamaktadır. Ancak *Candida* enfeksiyonu sırasında Th1 ve Th2 sitokin yanıtının enfeksiyonun farklı dönemlerinde etkin olduğu ve *Candida* enfeksiyonlarının patogeneğinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Th1/Th2 dengesinde oluşan değişikliklere bağlı olarak *Candida* enfeksiyonuna karşı korunma sağlanmakta veya enfeksiyon ilerlemektedir. *Candida* enfeksiyonundaki sitokin profilinin tam olarak belirlenebilmesi, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda önemli mortalite nedeni olan bu enfeksiyonlardan korunmada ve tedavisinde yeni seçeneklerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

KANDİDOZLU SIÇAN MODELİNDE IFN- γ , TNF- α , IL-10 İFADELENMESİNİN TERS TRANSKRİPTAZ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) İLE GÖSTERİLMESİ

VIII. ÖZET

Bağıışıklık sistemi baskılanmış hastaların her geçen gün artışında, geniş spektrumlu antibiyotiklerin daha yaygın kullanımı, organ nakillerinin çok daha sık yapılması gibi nedenler bu tür hastalarda kandidoz varlığının son yıllarda artış göstermesine neden olmaktadır.

Candida infeksiyonu sırasında oluşan immünolojik değişikliklerde pek çok faktör etkilidir. Bu nedenle çalışmamızda, kandidoz sırasında immünolojik parametrelerden olan sitokin profillerinde oluşan değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. İnfekte fare böbrek dokularında TNF- α , IFN- γ ve sitokinlerin IL-10 gibi sitokinlerin ekspresyonlarının belirlenmesinde RT-PCR yöntemi kullanılmıştır.

Çalışmamızdaki infeksiyon modeli, sıçanlara verilen *C. albicans* hücresi ile sağlanmıştır. Ayrıca *C. albicans* ile infekte edilmemiş kontrol grubu kullanılarak infekte grup ile karşılaştırma yapılmıştır. Hayvanlardan alınan böbrek dokularından yapılan kültür pozitif olarak bulunmuştur. RT-PCR yöntemi ile çalışılarak böbrek dokularında kandidoz oluşumu gösterilmiştir. Ayrıca, mantarlara özgül primerler kullanılarak infeksiyon varlığı doğrulanmıştır.

Kontrol grubunun PCR çalışması sonucunda TNF- α 10 örneğin 6'sında (% 60) pozitif ; IFN- γ 6'sında (% 60) pozitif ; IL-10 10 örneğin sadece 1'inde (% 10) pozitif bulunmuştur. Kandidemi grubunda ise TNF- α 12 örneğin 11'inde (% 91,6) pozitif ; IFN- γ 12 örneğin tamamında (% 100) pozitif ; IL-10 12 örneğin 9'unda (% 75) pozitif bulunmuştur.

Buna göre, kandidoz sırasında immün hücrelerle ilişkide sitokinlerin önemli rol oynadığı ve etken olan sitokin profillerinin tam olarak belirlenmesinin, Candida infeksiyonlarından korunmada ve tedavide yeni seçeneklerin geliştirilmesine olanak sağlayacağı düşünülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Candida, sitokin, RT-PCR

DEMONSTRATING THE EXPRESSION OF IFN- γ , TNF- α , IL-10 WITH REVERS TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION IN RAT CANDIDIASIS MODEL

VIII. SUMMARY

Everyday, the number of immunocompromised patients increases because of using wide spectrum antibiotics, making more organ transplantations; also in these patients, candidiasis are increased.

The immunological changes which occur during the Candida infections have been effected lots of factors. Because of this, we aimed to find the changes of cytokine profile which occur during candidiasis. We used RT-PCR method which determines the cytokine profiles such as TNF- α , IFN- γ , IL-10 in kidneys of infected rat.

C. albicans was given the rats, thus infection model of candidiasis was completed. Also, control group was formed for comparision with infected group. The kidney tissues which were taken from the infected rats, the culture results were positive. We showed rat's kidneys' candidiasis with RT-PCR. Also, the existence of infection was confirmed with spesific primers to fungus.

In control group, the results were like these: TNF- α % 60 (6/10), IFN- γ % 60 (6/10) and IL-10 % 10 (1/10). In infected group, the results were like these: TNF- α % 91,6 (11/12), IFN- γ % 100 (12/12) and IL-10 % 75 (9/12).

Accordingly, we think that cytokines are important to relation of immune cells during the candidiasis and determining the profiles of cytokines accommodates to protect from Candida infections and improved new alternatives in treatment.

Key words: Candida, cytokines, RT-PCR

KAYNAKLAR

- 1- Edwards J.E. *Candida* Species. In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th edition. New York: Churchill Livingstone; 1995. 2289-2305.
- 2- Abbas A.K., Lichtman A.H., editors. Cellular and molecular immunology, 5th ed., Philadelphia, Saunders, 2003.
- 3- Özbal Y., Temel İmmünoloji, 2. baskı, İstanbul: Nobel tıp kitabevleri; 2000.
- 4- Bilgehan H., Temel mikrobiyoloji ve bağışıklık bilimi. 10.baskı. İzmir: Barış yayınları; 2002.
- 5- John E, Edwards JR. *Candida* species. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practise of Infectious Diseases. 5th edition. Pennsylvania, Churchill Livingstone 2000; 2656-2674.
- 6- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., editors. Microbiology. Fourth edition. Singapore, McGraw-Hill Companies; 1999: 818-820.
- 7- Romani L. Overview of the fungal pathogens. In: Kauffmann H. E., Sher A., Ahmed R., editors. Immunology of infectious diseaes, Washington: ASM Press; 2003, 25-37.

- 8- Herring A.C., Huffnagle G.B. Innate immunity and fungal infections. In: Kauffmann H. E., Sher A., Ahmed R., editors. Immunology of infectious diseases. Washington: ASM Press; 2003, 127-137.
- 9- Casadevall A. Acquired immunity against fungi. In: Kauffmann H. E., Sher A., Ahmed R., editors. Immunology of infectious diseases, Washington: ASM Press; 2003. 223-234.
- 10-Dignani M. C., Solomkin J. S., Anaissie E. J. *Candida*. In: Anaissie E. J., editors. Clinical mycology. New York: Churchill Livingstone; 2003. 195-239
- 11-Vazquez J. A., Sobel J. D. Candidiasis. In: Dismukes W. E., editors. Clinical mycology. Oxford: Oxford University Press; 2003. 143-187.
- 12-Kwon-Chung K.J., Bennett J. E. Medical Mycology. Philadelphia, Lea and Febinger, 1992; 280-336.
- 13-Larone D.H. Medically important fungi :a guide to identification. Washington, D.C: ASM Press; 2002. 52-53.
- 14-Koneman E.W., Allen S.D., Dowell V.R., Janda W.M., Sommers H.M., Winn W.C., editors. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 3rd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1998. 573-636.
- 15- Tümbay E. *Candida* Türleri. İçinde: Ustaçelebi Ş., editörler. Temel ve klinik mikrobiyoloji. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. 1081-1086.

- 16-Yücel A. Bakteri, Parazit ve Funguslara Karşı İmmun Yanıt. İçinde: Ustaçelebi Ş., editörler. Temel ve klinik mikrobiyoloji. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. 267-289.
- 17-İmir T. İmmunoloji. İçinde: Ustaçelebi Ş., editörler. Temel ve klinik mikrobiyoloji. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. 119-166.
- 18-Hazen K.C., Howell S.A. Fungi- *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medial importance. In: Murray P.R., Jorgensen J.H., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover K.C., editors. Manual of Clinical Microbiology .Eighth edition. Washington D.C., American Society for Microbiology Press; 2003: 693-1711.
- 19-Topçu A.W., Çerikcioğlu N. *Candida* türleri. In:Topçu A.W., Söyletir G., Doğanay M. Editörler. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul, Nobel Matbaacılık; 2002: 1797-1808.
- 20-Kalkancı A., Kuştımur S., *Candida albicans* Hücre Duvar Yapıları. Enfeksiyon Dergisi 1999; 13(3): 467-471.
- 21-Ghannuoum M.A., Abu Elteen K.H. Pathogenity determinants of *Candida*. Mycoses 1990; 33: 265-282.
- 22-Kurokawa C. S., Sugizaki M.F., Peracoli M.T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1998; 40(3): 125-135.
- 23-Calderone R. A., Fonzi W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in Microbiology 2001; 9(7): 327-335.

- 24-Gale C. A., Bendel C. M., McClellan M., Hauser M., Becker J. M., Berman J., Hostetter M. K. Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. Science 1998; 279: 1355-1358.
- 25-Sundstrom P. Adhesins in *Candida albicans*. Curr. Opin. Microbiol. 1999; 2(4): 353-357.
- 26-Howard D. H. Acquisition transport and storage of iron by pathogenic fungi. Clin. Microbiol. Rev. 1999; 12: 394-404.
- 27-Douglas L. J. *Candida* biofilm and their role in infection. Trends in Microbiology 2003; 11: 30-36.
- 28-Mencacci A., Cenci E., Bacci A., Montagnoli C., Bistoni F., Romani L. Cytokines in Candidiasis and Aspergillosis . Current Pharmaceutical Biotechnology 2000; 1, 235-251.
- 29-Roitt I., Brostoff J., Male D. Immunology. 4.baskı. London: Mosby; 1996. 17,12.
- 30-Vazquez -Torres A., Balish E. Macrophages in Resistance to Candidiasis. Microbiology And Molecular Biology Reviews 1997; 61(2): 170-192.
- 31-Mullick A.,Leon Z., Min-Oo G., Berghout J.,Lo R., Daniels R., Gros P. Cardiac Failure in C5-Deficient A/J Mice after *Candida albicans* Infection. Infection And Immunity 2006 ; 74(8): 4439-4451.

- 32-Dongari-Bagtzoglou A., Fidel P.L. The Host Cytokine Responses and Protective Immunity in Oropharyngeal Candidiasis. J Dent Res 2005; 84 (11): 966-977.
- 33-Murciano C., Villamoín E., O'Connor J., Gozalbo D., Gil M.L. Killed *Candida albicans* Yeasts and Hyphae Inhibit Gamma Interferon Release by Murine Natural Killer Cells. Infection And Immunity 2006; 74(2): 1403-1406.
- 34-Romani L. Immunity to *Candida albicans* :Th1,Th2 cells and beyond. Current Opinion in Microbiology 1999; 2: 363-367.
- 35-Mencacci A., Cenci E., Del Sero G., Fe'd'Ostiani C., Mosci P., Trinchieri G., Adorini L., Romani L. IL-10 Is Required for Development of Protective Th1 Responses in IL-12-Deficient Mice upon *Candida albicans* Infection. The Journal of Immunology 1998; 161: 6228-6237.
- 36-Romani L. Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. J. Leukoc. Biol. 2000; 68: 175-179.
- 37-Ashman R. B., Papadimitriou J. M., Production and Function of Cytokines in Natural and Acquired Immunity to *Candida albicans* Infection Microbiological Reviews 1995; 59(4): 646-672.
- 38-Takeda K., Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. Int. Immunol. 2005, 17(1)1: 1-14.
- 39-Kitch T. T., Jacobs M. R., McGinnis M. R., Appelbaum P. C. Ability Of Rapid Yeast Plus System To Identify 304 Clinically Significant Yeasts

- Within 5 Hours. *Journal Of Clinical Microbiology* 1996; 34(5): 1069-1071.
- 40-Ellepola A. N. B., Morrison J. C. Laboratory Diagnosis Of Invasive Candidiasis. *The Journal Of Microbiology* 2005; 43(S): 65-84.
- 41-Odds F. C., Bernaerts R. Chromagar *Candida*, A New Differential Isolation Medium For Presumptive Identification Of Clinically Important *Candida* Species . *Journal Of Clinical Microbiology* 1994; 32 (8): 1923-1929.
- 42-Horvath L. L., George B. J., Murray C. K., Harrison L. S., Hospenthal D. R. Direct Comparison Of The BACTEC 9240 And BacT/ALERT 3D Automated Blood Culture Systems For *Candida* Growth Detection. *Journal Of Clinical Microbiology* 2004; 42(1): 115-118.
- 43-Berenguer J., Buck M., Witebsky F., Stock F., Pizzo P. A., Walsh T. J. Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of tissue-proven invasive candidiasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 17(2); 103-109.
- 44-Toubas D., Essendoubi M., Adt I., Pinon J. M., Manfait M., Sockalingum G. D. FTIR Spectroscopy In Medical Mycology: Applications To The Differentiation And Typing Of *Candida*. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387: 1729-1737.
- 45-Bulik D. A., Olczak M., Lucero H. A., Osmond B. C., Robbins P.W., Specht C. A. Chitin Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in Response to Supplementation of Growth Medium with Glucosamine and Cell Wall Stress. *Eukaryotic Cell* 2003; 2(5): 886-900.

- 46-Ponton J., Moragues M. D., Quindos G. Non-Culture-Based Diagnostics. In: Calderone R. A., editors. *Candida* and Candidiasis, 1st ed. Philadelphia: ASM Press; 2002. 395-441.
- 47-Yıldıran Ş. T. *Aspergillus*'a karşı doğal bağışıklık; Th1/Th2 dengesi. İçinde: Ener B., editörler. *Aspergillus*. 1.baskı. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, Klimik; 2006. 103-109.
- 48-Jones J. M. Laboratory Diagnosis of Invasive Candidiasis. Clinical Microbiology Reviews 1990; 3(1): 32-45.
- 49-Luo G., Mitchell T.G. Rapid Identification Of Pathogenic Fungi Directly From Cultures By Using Multiplex PCR. Journal Of Clinical Microbiology 2002; 40(8): 2860-2865.
- 50-Miyakawa Y., Mabuchi T., Kagaya K. , Fukazawal Y. Isolation and Characterization of a Species-Specific DNA Fragment for Detection of *Candida albicans* by Polymerase Chain Reaction. Journal Of Clinical Microbiology 1993; 30(4) : 894-900.
- 51-Arı Ş. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. İçinde: Temizkan G., Arda N., editörler. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 2. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2004. 101-120.
- 52-Hayden R. T. (Dolapçı İ.) İn Vitro Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri. İçinde: Persing D. H., Tenover F. C., Versaloviç J., Tang Y., Unger E. R., Relman D.A., White T. J., editors. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar.1. baskı. Ankara: Palme Yayınevi; 2006. 43-69.

- 53-Köksal F. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri. İçinde:Durmaz R (ed),
Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji (2. baskı) Nobel Kitabevi, Malatya
2001;15-34.
- 54-Atkins S. D., Clark I. M. Fungal Molecular Diagnostics: A Mini
Review. J. Appl. Genet. 2004; 45(1): 3-15.
- 55-Beck-Sague, C., W. R. Jarvis, et al. Secular trends in the
epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States,
1980-1990. J. Infect. Dis. 1993;167: 1247-1251.
- 56-Brandt M. E., Warnock D.W. Laboratory aspects of medical
mycology. In: Clinical Mycology Dismukes W. E., Pappas P. G.,
Sobel J. D., editors, Oxford University Pres, 2003, p 1-22.
- 57-Alexander B. D. Diagnosis of fungal infection: new Technologies for
the mycology laboratory. Transplant. Infect. Dis. 2002; 4(3): 32-37.
- 58-Çırak M. Y., Kalkancı A., Kuştimur S. Use of molecular methods in
identification of Candida species and evaluation of fluconazole
resistance. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2003; 98: 1027-1032.
- 59-O'Shaughnessy E. M., Shea Y. M., Witebsky F. G. Laboratory
diagnosis of invasive mycoses. Infect. Dis. Clin. North Am. 2003;
17(1):135-158.
- 60-Schwesinger G., Junghans D., Schröder G., Bernhardt H., Knoke M.
Cnadidosis and aspergillosis as autopsy findings from 1994 to 2003.
Mycoses 2005; 48: 176-180.
- 61-Bialek R., Konrad F., Kern J., Aespinus C., Cecenas L., Gonzales
G.M., Just-Nübling G., Williger B., Presterl E., Lass-Flörl C., Rickerts

- V. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in parafin wax embedded tissue. J. Clin. Pathol. 2005; 58: 1180-1184.
- 62-Burik J.A., Myerson D., Schreckhise R.W., Bowden R.A. Panfungal PCR Assay For Detection Of Fungal Infection In Human Blood Specimens. Journal Of Clinical Microbiology 1998; 36(5): 1169-1175.
- 63-Kercher L., Wardwell S. A., Wilhelmus K. R., Mitchell B.M. Molecular Screening of Donor Corneas for Fungi before Excision. Investigative Ophthalmology & Visual Science 2001; 42(11): 2578-2583.
- 64-Beggs K.T., Holmes A.R., Cannon R.D., Rich A.M. Detection Of *Candida albicans* mRNA In Archival Histopathology Samples By Reverse Transcription-PCR. Journal Of Clinical Microbiology 2004; 42(5): 2275-2278.
- 65-Okeke C. N., Tsuboi R., Ogawa H. Quantification Of *Candida albicans* Actin mRNA By The Lightcycler System As A Means Of Assessing Viability In A Model Of Cutaneous Candidiasis. Journal Of Clinical Microbiology 2001; 39(10): 3491-3494.
- 66-Hayashi R., Kitamoto N., Lizawa Y., Ichikawa T., Itoh K., Kitazaki T., Okonogi K. Efficacy Of TAK-457, A Novel Intravenous Triazole, Against Invasive Pulmonary Aspergillosis In Neutropenic Mice. Antimicrobial Agents And Chemotherapy 2002; 46(2): 283-287.
- 67-Balloy V., Huerre M., Latge´ J. P., Chignard M. Differences In Patterns Of Infection And Inflammation For Corticosteroid Treatment And Chemotherapy In Experimental Invasive Pulmonary Aspergillosis. Infection And Immunity 2005; 73(1): 494-503.

- 68-Antachopoulos C., Roilides E. Cytokines and fungal infections. *British Journal of Haematology* 2005; 129, 583-596.
- 69-Ashman R. B., Farah C. S., Wanasaengsakul S., Hu Y., Pang G., Clancy R. L. Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection. *Immunology and Cell Biology* 2004; 82, 196-204.
- 70-Romani L., Mencacci A., Grohmann U., Mocci S., Mosci P., Puccetti P., Bistoni F. Neutralizing Antibody to Interleukin 4 Induces Systemic Protection and T Helper Type 1-associated Immunity in Murine Candidiasis *J. Exp. Med.* 1992; 176: 19-25.
- 71-Dinarello C. A. Proinflammatory Cytokines. *Chest* 2000; 118: 503-508.
- 72-Ashman R. B. *Candida albicans*: pathogenesis, immunity and host to Th2 polarization. However, GPCR triggering in responder defence. *Res. Immunol.* 1998; 149: 281-288.
- 73-Xing Z., Gauldie J., Cox G., Baumann H., Jordana M., Lei X., Achong M. K. IL-6 is an Antiinflammatory Cytokine Required for Controlling Local or Systemic Acute Inflammatory Responses. *J. Clin. Invest* 1998; 101: 311-320.
- 74-Steinshamn S., Waage A. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-6 in *Candida albicans* Infection in Normal and Granulocytopenic Mice. *Infection And Immunity* 1992 ; 60 (10): 4003-4008.
- 75-Louie A., Baltch A. L., Smith R. P., Franke M. A., Ritz W. J., Singh J. K., Gordon M. A. Tumor Necrosis Factor Alpha Has A Protective Role

- In A Murine Model Of Systemic Candidiasis. *Infection And Immunity* 1994 ; 62(7): 2761-2772.
- 76-Riipi L., Carlson E. Tumor Necrosis Factor (TNF) Is Induced In Mice By *Candida albicans*: Role Of TNF In Fibrinogen Increase. *Infection And Immunity*, 1990; 58(9): 2750-2754.
- 77-Gaforio J. J., Ortega E., Algarra I., Serrano M. J., Cienfuegos G.A. NK Cells Mediate Increase of Phagocytic Activity but Not of Proinflammatory Cytokine (Interleukin-6 [IL-6], Tumor Necrosis Factor Alpha, and IL-12) Production Elicited in Splenic Macrophages by Tilorone Treatment of Mice during Acute Systemic Candidiasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002; 9(6): 1282-1294.
- 78-Kubota Y., Iwasaki Y., Harada H., Yokomura I., Ueda M., Hashimoto S., Nakagawa M. Role of Alveolar Macrophages in *Candida*-Induced Acute Lung Injury. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology* 2001; 8(6): 1258-1262.
- 79-Steele C., Fidel P. L. Cytokine and Chemokine Production by Human Oral and Vaginal Epithelial Cells in Response to *Candida albicans* *Infection And Immunity* 2002 ; 70(2): 577-583.
- 80-Kalkancı A. Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α) ve Platelet Aktivatör Faktör (PAF) etkileşiminin Kandidozdaki Rolünün Farede Gösterilmesi. Doktora. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2000.
- 81-Marodi L., Schreiber S., Anderson D. C., MacDermott R. P., Korchak H. M., Johnston R. B. Enhancement of Macrophage Candidacidal Activity by Interferon- γ Increased Phagocytosis, Killing, and Calcium

Signal Mediated by a Decreased Number of Mannose Receptors.J.
Clin. Invest. 1993; 91: 2596-2601.

82-Fratti R. A., Ghannoum M. A., Edwards J. E., Filler S. G. Gamma Interferon Protects Endothelial Cells from Damage by *Candida albicans* by Inhibiting Endothelial Cell Phagocytosis. Infection And Immunity 1996; 64(11): 4714-4718.

83-Lavigne L. M., Schopf R. L., Chung C. L., Maylor R., Sypek J. P. The Role of Recombinant Murine IL-12 and IFN- γ in the Pathogenesis of a Murine Systemic *Candida albicans* Infection The Journal of Immunology 1998; 160: 284-292.

84-Netea M. G., Stuyt R. J. L., Kim S., Van der Meer J. V. M., Jan Kullberg B., Dinarello C. A. The Role of Endogenous Interleukin (IL)-18, IL-12, IL-1b, and Tumor Necrosis Factor - α in the Production of Interferon- γ Induced by *Candida albicans* in Human Whole-Blood Cultures. The Journal of Infectious Diseases 2002; 185: 963-970.

85-Ka' Poszta R., Tree P., Szlo' Maro' Di L., Gordon S. Characteristics of Invasive Candidiasis in Gamma Interferon- and Interleukin-4-Deficient Mice: Role of Macrophages in Host Defense against *Candida albicans*. Infection And Immunity 1998; 66(4): 1708-1717.

86-Qian Q, Cutler J. E. Gamma Interferon Is Not Essential in Host Defense against Disseminated Candidiasis in Mice. Infection and immunity 1997; 65(5) :1748-1753.

87-Roilides E., Anastasiou-Katsiardani A., Dimitriadou-Georgiadou A., Kadiltsoglou I., Tsaparidou S., Panteliadis C., Walsh T.J. Suppressive Effects of Interleukin-10 on Human Mononuclear

- Phagocyte Function against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. The Journal of Infectious Diseases 1998; 178: 1734-1742.
- 88-Levitz S. M, Tabuni A., Nong S., Golenbock D. T. Effects of Interleukin-10 on Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Responses to *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and Lipopolysaccharide. Infection And Immunity 1996; 64(3): 945-951.
- 89-Tavares D., Ferreira P., Arala-Chaves M. Increased Resistance To Systemic Candidiasis In Athymic Or Interleukin-10-Depleted Mice. The Journal Of Infectious Diseases 2000; 182: 266-273.
- 90-Vazquez-Torres A., Jones-Carson J., Wagner R. D., Warner T., Balish E. Early Resistance of Interleukin-10 Knockout Mice to Acute Systemic Candidiasis. Infection And Immunity 1999; 67(2): 670-674.
- 91-Mencacci A., Perruccio K., Bacci A., Cenci E., Benedetti R., Martelli F. M., Bistoni F., Coffman R., Velardi A., Romani L. Defective antifungal T-helper 1 (TH1) immunity in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation and its restoration by treatment with TH2 cytokine antagonists. Blood 2001; 97: 1483-1490.
- 92- Romani L. Immunity to fungal infections. Nature Reviews Immunology 2004; 4: 11-24.
- 93-Hernandez Y., Arora S., Erb-Downward J. E., McDonald R. A., Toews G. B., Huffnagle G. B. Distinct Roles for IL-4 and IL-10 in Regulating Th2 Immunity during Allergic Bronchopulmonary Mycosis. The Journal of Immunology 2005; 174: 1027-1036.

- 94-Schaller M., Boeld U., Oberbauer S., Hamm G., Hube B., Korting H. C. Polymorphonuclear Leukocytes (PMNS) Induce Protective Th1-Type Cytokine Epithelial Responses In An In Vitro Model Of Oral Candidosis. *Microbiology* 2004; 150: 2807-2813.
- 95-Brieland J., Essig D., Jackson G., Frank D., Loebenberg D., Menzel F., Arnold B., Didomenico B., Hare R. Comparison of Pathogenesis and Host Immune Responses to *Candida glabrata* and *Candida albicans* in Systemically Infected Immunocompetent Mice. *Infection And Immunity* 2001; 69(8): 5046-5055.
- 96-Schaller M., Mailhammer R., Korting H. C. Cytokine expression induced by *Candida albicans* in a model of cutaneous candidosis based on reconstituted human epidermis . *J. Med. Microbiol.* 2002; 51: 672-676.
- 97-Lilic D., Gravenor I., Robson N., Lammas D.A., Drysdale P., Calvert J. E., Cant A. J., Abinun M. Deregulated Production Of Protective Cytokines In Response To *Candida albicans* Infection In Patients With Chronic Mucocutaneous Candidiasis. *Infection And Immunity* 2003; 71(10): 5690-5699.
- 98-Netea M. G., Gow N. A. R., Munro C. A., Bates S., Collins C., Ferwerda G., Hobson R. P., Bertram G., Hughes H. B., Jansen T., Jacobs T. L., Burman E. T., Gijzen K., Williams D. L., Torensma R., McKinnon A., MacCallum A. M., Odds F. C., Van der Meer J. V. M., Brown A. J. P., Kullberg B. J. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *The Journal of Clinical Investigation* 2006; 116(6): 1642-1650.

- 99-Kobayashi M., Kobayashi H., Herndon D. N., Pollard R. B., Suzuki F. Burn-Associated *Candida albicans* Infection Caused By CD30⁺ Type 2 T Cells. J. Leukoc Biol. 1998; 63: 723-731.
- 100- Van Der Graaf C. A. A., Netea M. G., Verschueren I., Van Der Meer J. W. M., Kullberg B. J. Differential Cytokine Production And Toll-Like Receptor Signaling Pathways By *Candida albicans* Blastoconidia And Hyphae. Infection And Immunity 2005; 73(11): 7458-7464.
- 101- Tetikkurt C. Renkli İmmunoloji Atlası. 1. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2006.
- 102- Piccinni M. P., Vultaggio A., Scaletti C., Livi C., Gomez M. J., Giudizi M. G., Biagiotti R., Cassone A., Romagnani S., Maggi E. Type 1 T Helper Cells Specific for *Candida albicans* Antigens in Peripheral Blood and Vaginal Mucosa of Women with Recurrent Vaginal Candidiasis The Journal of Infectious Diseases 2002; 186: 87-93.
- 103- Elahi S., Pang G., Clancy R., Ashman R. B. Cellular and Cytokine Correlates of Mucosal Protection in Murine Model of Oral Candidiasis. Infection And Immunity 2000; 68(10): 5771-5777.

ÖZGEÇMİŞ

EMİNE YEŞİLYURT

Doğum Tarihi : 23.07.1982
Doğum Yeri : Almanya
Meslek : Biyolog
Yazışma Adresi : Demetgül Mah. 3. Sok. 6/7 Köşe Apt. 06200
Demetevler / ANKARA
E-mail : emineyesilyurt2001@yahoo.com

EĞİTİM

2005-2007 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümü Yüksek Lisansı
2000-2004 Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
1996-2000 Alparslan Süper Lisesi
1993-1996 Demetevler Ortaokulu
1988-1993 İsmail Erez İlkokulu

YABANCI DİL

İngilizce