

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KANDİDEMİLİ HASTA SERUMLARINDA
BAZI SİTOKİNLERİN BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sevgi ÖZYEĞEN ASLAN

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayşe KALKANCI**

**ANKARA
EYLÜL 2011**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KANDİDEMİLİ HASTA SERUMLARINDA
BAZI SİTOKİNLERİN BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sevgi ÖZYEĞEN ASLAN

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayşe KALKANCI**

**ANKARA
EYLÜL 2011**

KABUL VE ONAY

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tez Sınav Tutanağı

Adı ve Soyadı	Sevgi ÖZYEĞEN ASLAN
Baba Adı	Makbul
Doğum Yeri/Tarihi	25.04.1978 KÜTAHYA
Diploma Tarihi/Diploma No	01.06.2002 / 2002 - 1778
Mezun Olduğu Fakülte	Cumhuriyet Üniv. Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı / Bilim Dalı	Tıbbi Mikrobiyoloji
İhtisas Süresi	Yıl : 4 Ay: 7
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniv. Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI : Kandidemili Hasta Serumlarında bazı sitokinlerin belirlenmesi

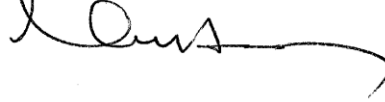
JÜRİ KARARI :

Tez savunma sınavı oy birliği ile başarılı kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ :

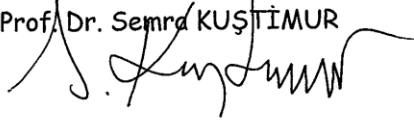
BAŞKAN

Prof. Dr. Nedim Sultan



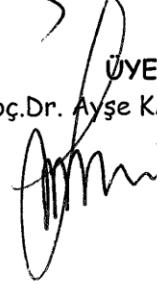
ÜYE

Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR



ÜYE

Doç. Dr. Ayşe KALKANCI



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde ve tezimin hazırlanmasında bilgi ve deneyimlerini, desteğini ve çabasını benden hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe Kalkancı'ya, her zaman içten yardımlarını gördüğüm değerli hocam Sayın Prof. Dr. Semra Kuştimur' a, tezimin gelişimine bilgi ve katkılarıyla yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Işıl Fidan'a, uzmanlık eğitimim boyunca her konuda desteğini yanımda hissettiğim Sayın Doç.Dr. Funda Doğruman Al'a, değerli hocalarım Sayın Prof.Dr. Nedim Sultan, Sayın Prof. Dr. Seyyal Rota, Sayın Prof.Dr. Turgut İmir, Sayın Prof.Dr. Meltem Yalınay Çırak, Sayın Doç. Dr. Kayhan Çağlar ve Sayın Doç. Dr. Gülendamar Bozdayı'ya ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma, her zaman yanımda olan sevgili aileme, canım eşime ve dünyalar tatlısı Zeynep'ime sonsuz teşekkürler.

KISALTMALAR

AIDS	: Edinsel Başışıklık Yetmezlik Sendromu
ELISA	: Enzim Bağlanmış İmmünosorbent Yöntemi
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TGF	: Transforming Growth Faktör
IFN	: Interferon
IL	: Interlökin
GIS	: Gastrointestinal Sistem
SDA	: Sabouroud Dekstroz Agar
NK	: Doğal Öldürücü Hücreler
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
PNL	: Polimorf Nüveli Lökosit
MPO	: Miyeloperoksidaz
KMK	: Kronik Mukokutanöz Kandidoz
LT	: Lenfotoksin
MAF	: Makrofaj Aktive Edici Faktör
LPS	: Lipopolysakkarit
KT	: Kemoterapi
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
IMI	: İnvaziv Mantar İnfeksiyonu

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay

Kısaltmalar

İçindekiler

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Taksonomi.....	3
2.3. Epidemiyoloji	4
2.4. Mikrobiyolojik Özellikleri	6
2.4.1. Genel Özellikler	6
2.4.2. <i>Candida</i> 'ların Hücre İnce Yapısı.....	7
2.4.3 Patojenite ve Virülans	8
2.5. <i>Candida</i> Enfeksiyonlarında Bağışıklık Sisteminin Rolü	15
2.5.1. Hücresel Bağışık Yanıt.....	15
2.5.2. Sıvısal bağışıklık	30
2.6. <i>Candida</i> Türlerinin Neden Olduğu Enfeksiyonlar	31
2.6.1. Kutanöz ve Mukozal Kandidoz:	31
2.6.2. Kronik Mukokutanöz Kandidoz (KMC)	34
2.6.3. Sistemik Kandidoz	34
2.7. Kandidozda Tanı	37
2.8. Kandidoz Tedavisi.....	42
2.9. İnvaziv Kandidozda Antifungal Profilaksi Yaklaşımı	48
3. GEREÇ ve YÖNTEM	50
3.1. Gereçler	50
3.1.1. Laboratuvar araçları	50
3.1.2. Sarf Malzemeler	51
3.2. Yöntemler	51
3.2.1. Alınan örneklerle yapılan işlemler	51
3.2.2. DNA'nın eldesi.....	52
3.2.3. Saflaştırma Basamakları.....	52
3.2.4. DNA' nın çoğaltılması ve gösterilmesi.....	53

3.2.5. ELISA ile Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi	56
3.3. Araştırılan Diğer Parametrelerin Tespiti.....	68
3.4. İstatistiksel Analiz	68
4.1. Hastaların Bazı Tanımlayıcı Özellikleri.....	69
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇLAR.....	88
7. KAYNAKLAR.....	90
8. ÖZET	99
8. SUMMARY	100
9. TABLO LİSTESİ	101
11. ŞEKİL LİSTESİ	103
12. ÖZGEÇMİŞ	104

KANDİDEMİLİ HASTA SERUMLARINDA BAZI SİTOKİNLERİN BELİRLENMESİ

1. GİRİŞ

Antibiyotiklerin yaygın olarak kullanımı, organ nakillerinin çok 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 (1,2).

Normal flora elemanı olarak deri, mukoza ve sindirim sisteminde bulunan *Candida* türleri insanda fırsatçı infeksiyonların en önemli nedenlerindendir. *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 (2-4).

Hücreler arası ilişkiler bir yandan iki hücrenin doğrudan doğruya birbirleri ile ilişki kurmaları, bir yandan da oluşturdıkları 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 (2,5). Son yıllarda sitokinlerin gösterilmesi için serolojik yöntemler yanında moleküler yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde birçok tanı laboratuvarlarında yaygın olarak ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) testleri kullanılmaktadır. Bu testlerin avantajları arasında geniş enfeksiyon tanı parametrelerinin ticari olarak temin edilmesi, yöntemin otomasyona uyarlanabilirliği ve böylece çok sayıda örneğin kısa sürede çalışılabilmesi, sonuçların spektrofotometrede objektif olarak kalitatif, semikantitatif ya da kantitatif değerlendirilmesi gibi özellikler sayılabilir (2,3,6).

Bu çalışmada, kandidemisi polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile gösterilmiş bağışıklık sistemi baskılanmış hasta grubunda, kandidemi olmadığı PZR ile doğrulanmış bağışıklık sistemi baskılanmış kontrol grubunda ve sağlıklı kontrol grubunda TNF- α , TGF- β , IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-2 ve IL-17 sitokinlerinin ELISA yöntemiyle araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

M.Ö. 4. yüzyılda Hipokrat ve Galen'in 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 tanımlamıştır. 1841'de Emil Berg tarafından sağlıklı bebeklerde pamukçuğun mantarlardan kaynaklanabileceği düşünülmüş ve fungal etyoloji araştırılmıştır (1). *Candida albicans* için tanımlanan 100'den fazla sinonimden ikisi 1890'da Zopf'un kullandığı *Monilia albicans* ve 1923'de Berkhout'un kullandığı *C.albicans*'dır. 1940'larda antibiyotiklerin kullanıma girmesiyle daha önceden rastlanmayan *Candida* enfeksiyonlarının çeşitli klinik formları görülmeye başlanmıştır (7).

2.2. Taksonomi

Candida cinsi 200'ün üzerinde tür içermektedir. Bu türlerden bazıları insanlarda hastalık yapmaktadır. Bunların içinde *Candida albicans* en önemli patojen olarak yer alır ve yaygın mukozal ve sistemik mantar enfeksiyonlarına neden olur. Klinik açıdan önemli diğer *Candida* türleri: *Candida glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* ve *C. dubliniensis*'dir.

Candida; *Mycetae* aleminin *Amastigomycota* bölümüne, *Deuteromycetes* sınıfına, *Blastomyces* alt sınıfına ait *Cryptococcaceae* ailesinin *Candida* cinsinde sınıflandırılmıştır (8).

2.3. Epidemiyoloji

Maya enfeksiyonlarının prevalansında, son 10 yıldan bu yana artış olduğu belirtilmektedir. Bunda; patolojik ve iyatrojenik immunosupresyon ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımındaki artış başta gelen en önemli nedenlerdir.

Candida'ların 200'den fazla türü bilinmektedir; fakat bunların küçük bir kısmı insanlar için patojendir (9). *Candida* türleri normal koşullarda insanların %30-50'sinin gastro-intestinal sistem (GİS) ve kadınların %20-30'unun genital kanal florasında bulunur. *Candida albicans* florada en sık bulunan türdür. Ancak *C.albicans*, *C.guilliermondii* ve *C.parapsilosis* gibi diğer türlere göre, deri florasında ender olarak bulunur. Buna karşılık, *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis* gibi diğer patojen türler toprak veya bitkilerden izole edilebilirler. *Candida albicans* tüm kandidozlarda en sık görülen etkindir; diğer *Candida* türleri de hem yüzeysel hem de derin enfeksiyon yapabilirler. *Candida* türleriyle gelişen invaziv enfeksiyonların epidemiyolojisinde son yıllarda önemli değişiklikler meydana gelmiştir. Birçok hematopoetik kök hücre transplant merkezinde *Candida* türlerinin hastaların mortalite ve morbiditesinde etkisi flukonazol profilaksisi ile dramatik bir düşüş göstermiş, ancak bu kez *C.albicans* dışındaki türlere bir kayma

olmuştur (10). Son yıllarda *C.albicans* sistemik kandidoz olgularında %40-50'lık bir oranla görülürken, sıklık sırasına göre, *C.tropicalis* (%8-43), *C.glabrata* (%5-35), *C.parapsilosis* (%7), *C.krusei* (%4) ve diğer türler izole edilmektedir (2).

C.albicans: GİS, vajen ve ağız boşluğu normal flora üyesidir. Aynı zamanda fırsatçı mantar enfeksiyonlarına yol açan majör insan patojenlerindendir.

C.tropicalis: Endojen enfeksiyonların yanı sıra, yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde görevli personelin ellerindeki kontaminasyon ile ilişkili fungemi olguları da bildirilmiştir.

C.glabrata: Ağız boşluğundan ve takma diş stomatitli olgulardan en fazla izole edilen türdür. Kandida enfeksiyonlarında, etken olarak sıklığı giderek artmaktadır.

C.parapsilosis: Doğada yaygın olarak bulunduğu gibi, özellikle subungal bölgelerde normal insan florasında yer alır. Yüksek konsantrasyonda glukoz içeren çözeltilerde ve protezlerde kontaminant olarak varlığı dikkati çekmektedir (9).

C. krusei: Nötropenik hastalarda ağır tablo seyreden fırsatçı enfeksiyonlara yol açarken, süt bebeklerinde diyare etkeni olabilmektedir. Flukonazole karşı doğal direnç göstermesi önemini giderek arttırmaktadır (9).

C.quiliermondii: Yüzme havuzu, toprak, deniz suyu gibi değişik çevrelerden, insan derisinden izole edilebilmektedir. Damar içi madde bağımlılığı olanlarda endokardite yol açabilmektedir (9).

C.lusitaniae: Tıbbi açıdan son yıllarda önem kazanan bir türdür. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda sistemik kandidoza yol açmakta ve kan, balgam, üriner ve GİS örneklerinden izole edilmektedir. Amfoterisin B'ye karşı doğal dirençli kökenlerin izolasyonu önemini arttırmıştır (9).

C.pelliculosa: Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalardaki damar içi katater kökenli fungemi olgularından izole edilmektedir. Özellikle çocuk yaş grubunda etkindir (9,11).

2.4. Mikrobiyolojik Özellikleri

2.4.1. Genel Özellikler

Candida türleri; çoğunlukla tek hücreli, tek çekirdekli, 4-6 µm büyüklüğünde, oval, kapsülsüz, maya benzeri mantarlardır. Tomurcuklanarak çoğalırlar. Blastokonidiyum veya blastosporlar olarak görülürler (12). Ayrıca yalancı hif de oluştururlar. Yalancı hif, arka arkaya tomurcuklanan blastokonidiyumların birbirinden ayrılamayarak uzaması ve aralarında boğumlar oluşturarak yaptıkları hücreler dizisidir. *Candida* türleri içinde *C.albicans* blastokonidiyum ve yalancı hif yanında gerçek hifler de oluşturup dimorfik özellik gösterir (2). Bazı istisnalar haricinde *Candida* cinsi içindeki mayaların makroskopik ve mikroskopik özellikleri farklılık göstermez. Hepsi, 25°C yada 37°C'de 2-3 günde Sabouraud dekstroza (SDA) 2-3 mm çapında, beyaz veya krem renkli, düzgün yüzeyli veya göbekli, mat ya da parlak koloniler oluştururlar (9).

2.4.2. *Candida*'ların Hücre İnce Yapısı

2.4.2.1. Hücre İskeleti

Mantar hücresinin iskeleti turgor basıncına karşı koyan aktif bir yapıdır. İskelet, hücre duvarı ve hücre membranı ile bağlantılıdır. Mikrotübüller, membranın dinamizminde rol alırlar. Aktin, sitoplazmik akışkanlıktan sorumludur. Miyozin, aktin ile beraber organellerin hareketliliğini sağlar (9).

2.4.2.2. Hücre Duvarı ve Antijenik Yapı

Hücre duvarı mantar hücresinin biçimini, şeklini, virulansını, mantar-konak etkileşimini ve antifungallere duyarlılığını belirleyen dinamik ve kompleks çok katlı bir yapıdır. Mantar hücresinin maya, hif gibi büyüme formlarındaki tipik şekillerinin korumasından sorumludur. Ayrıca mikroorganizma ile konak arasındaki etkileşimin başlangıç aşamasına aracılık eder. Maya veya hif şekilleri esasen kitin ve selüloz içeren sert yapılı bu dış tabakada büyüme formlarının çeşitli aşamalarında mantarın gereksinimlerine uygun bileşim ve oranlarda glukanlar, peptidomannanlar, polisakkaritler ve glikoproteinler bulundurulur (13). Duvar bileşenlerinin % 80-90'ı karbonhidratlar, % 5-15'i protein, % 2-5'i lipidlerden oluşur. Duvarın karbonhidrat bileşimi ise % 50-60 β -glukan, % 20-30'u mannoprotein, % 0.6-9'u kitin bulunmaktadır (14).

2.4.2.3 Hücre Membranı

Hücre membranı taşıdığı ozmoenzimler aracılığı ile moleküllerin iç ve dış ortama geçişinde görev alır. Duvar sentezinde rol alan kitin sentetaz gibi enzimler de burada bulunur. Tüm mantarlarda olduğu gibi, *Candida*'ların da hücre membranında bulunan sterol, membran lipidlerinin % 20'sini oluşturur, bunun da % 95'i, ergosteroldür ve antifungaller için önemli bir hedef noktasıdır.

2.4.3 Patojenite ve Virülans

Candida normal koşullarda, özellikle gastro-intestinal olmak üzere, florada bulunduğundan infeksiyonları çoğu kez endojen kaynaklıdır. Genellikle infeksiyondan önce florada bulunan mantar sayıca bir artış gösterir (*kolonizasyon*) ve kolonizasyonu infeksiyon izler (2).

Candida türlerinin oluşturduğu infeksiyonların oluşumunda konağa ait faktörler ve mantara ait faktörler arasındaki denge önemlidir. *Candida* türlerine karşı konağın direnç faktörleri; deri ve mukoza bütünlüğü, epidermal proliferasyon, fagositoz ve fagositik öldürme mekanizmaları, lizozim, laktoferrin, doğal öldürücü (NK) hücreler, kompleman sistemi, T hücre bağımlı immünite, sitokinler ve antikorlar olarak sayılabilir. Konağa ait predispozan faktörler ise immunsupresif sağaltım, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, intravenöz kateter, mekanik ventilasyon, parenteral beslenme, AIDS, diyabet, ağır cerrahi

girişimler, maligniteler, idrar sondası, endokrinolojik ve hematolojik hastalıklar ve yanık şeklinde sıralanabilir (9,13,15).

Candida'ların özellikle de majör patojen olan *C.albicans*'ın kandidoz patogenezinde rolü olduğu ileri sürülen virülans faktörleri bulunmaktadır. Bu virülans faktörleri:

1)Konak hücre yüzeyine tutunma (adezyon): Adezyon; mayanın konak ile ilişki kurmasında ilk basamağı oluşturur. Yapışma, hücrelerin yüzey özellikleri ile ilişkilidir ve mukokutanöz kandidozun bu yapışma ile başladığı kabul edilmektedir. *Candida*'ların mukoza epitel ve endotel hücrelerine yapışması kolonizasyonun da ilk aşamasıdır (12). Maya hücresinin konak hücre yüzeyine tutunmasında, konağın hormonal ve immünolojik koşullarının yanı sıra, mantarın yüzey özelliklerinin de önemi vardır:

a-Hücre Yüzeyinin Hidrofobik zelliği: Yüksek galaktoz yoğunluğunda reyenlerin yanı sıra, 25⁰C'de üreyen mayaların ve hifal formların hidrofobik özelliği daha fazladır.

b-Yüzey adezinleri: Konağın epitelyum ve endotel hücrelerine tutunmada rolleri olan moleküllerdir.

iC3b reseptörü: Maya hücresinin yüzeyindeki bu molekül, konak hücre yüzeyindeki arjinin-glisin-asparajin (RGD) yapısındaki reseptörlere tutunur. Bu molekülün, nötrofiller tarafından mayanın fagositozunu engellediği de düşünülmektedir.

C3d reseptörü: Komplemanın C3d komponenti için reseptör görevi gören ve memelilerdeki CR2 integrin reseptörü ile benzerliğe sahip bir moleküldür.

Glukoz ve mannoz açısından da zengin olduğundan plastik yüzeylere tutunmada da görev alır.

Fibronektin reseptörü: Konak hücreye tutunmada Ca^{++} iyonlarına bağımlılık gösteren bir moleküldür. *C.albicans* ve *C.tropicalis* kökenleri fibronektin reseptörleri aracılığıyla subendotelyal ekstra sellüler matriks proteinlerine tutunur.

Östrojen reseptörü:

Yapışkan mannoprotein: Üreme hormonlarının vajen epitellerindeki glikojeni arttırıcı etkisi ve maya hücrelerindeki östrojen reseptörleri, vajinal kolonizasyonu kolaylaştırır. Yüksek galaktozlu ortamda fibriller yapısının artışı ile paralellik gösterir. *Candida albicans*'ın mannoproteini ile yüzeyinde fukoz bulunduran epiteller arasındaki ilişki ilgi çekicidir. Gerek “0” kan grubu antijenine sahip olan gerekse, sekretuar olmayıp Lewis antijeni taşıyan bireylerin ağız ve vajen epitellerinde bulunan fukoz ile *Candida* mannoproteinleri arası birbirini tanımaya dayalı ilişki; belirtilen özellikteki kişilerde oral ve vajinal kandidoza eğilimi açıklamaktadır.

Salgısal asit proteinaz: Konak hücrelerinde invazyon ve kavitasyon gibi olaylardan sorumlu bir enzimdir. Aynı zamanda hücrenin adezyonuna yola açan bir adezyon faktörüdür.

Faktör 6 (Antijen 6): *Candida albicans* serotip A kökenlerinde mannoprotein katmanının en dışında yer alan bir epitoptur.

Laminin reseptörü: *Candida*'lar, bu reseptörlerin aracılığı ile aortik ve mikrovasküler endotelial hücrelerdeki ligandlara tutunurlar. Laminin reseptörleri, *C.albicans*'ın sadece hifal formunda ve germ tüpde vardır.

Fibrinojen bağlayan proteinler: *C.albicans*'ın germ tüp ve hifal formunda bulunur. Özellikle böbrek ve üretral epitellere tutunmada rol alırlar.

ALS proteinleri: Serin-treonin içeren proteinler olup, insan yanak epitellerine ve fibronektine tutunmakta rol alırlar.

HWP 1P ve INT-1 proteinleri: Maya formundan hifal forma geçişte ve yanak epitellerine tutunmada rol almaktadırlar.

2) Maya-Hif Dimorfizmi: *C. albicans* kültürde tomurcuklanan oval maya hücreleri (blastokonidyumlar) ve uzun mayamsı hücrelerden oluşan psödohifler veya nadir de olsa gerçek bölmeli hifler halinde gelişebilen dimorfik bir mayadır. *Candida* türleri içerisinde miçelyum üreterek çoğalabildiği bilinen tek tür *C. albicans*'dır. Hem gerçek hifler hem de psödohifler mayamsı blastokonidi kümeleri üreterek maya şeklinde de gelişebilirler; sıcaklık, pH ve besiyeri gibi ortam koşulları gelişecek fenotipi belirler (12).

Hifal forma dönüşümün ilk basamağı germ tüp oluşumudur. Hif formu, maya formuna göre dokuya ve plastik yüzeylere daha fazla yapışır; fagosite edilemez. *Candida albicans* kökenlerinde CPH 1 ve EFG 1 genleri dimorfizmde rol almaktadır. *Candida glabrata*'da saptanan CHP 1 analogunun ise hem hücre duvarı biyosentezinde hem de virülansta önemi olduğu belirtilmiştir (9).

3) Fenotipik Değişim: *Candida albicans* kökenlerinde yüksek sıklıkta spontan fenotipik değişim saptanmıştır. Bu değişim, başlıca iki kategoride gerçekleşmektedir:

Kolonilerdeki White-Opaque (w-o) (beyaz-opak) değişimi, 10^{-4} sıklıkta oluşur ve koloni düzeyinde olduğu kadar, mikroskopik olarak da hücrelerin küresel ya da uzamış şekilde farklı görüntülerine yol açar.

Koloni morfolojisinde 10^{-2} , 10^{-3} sıklıkta oluşan değişim sonucu “Smooth” (s) (düzgün yüzeyli) tipinden, miçelyal forma, yıldız tipi, halka tipi gibi değişik formlara değişim olabilir. İn vivo koşullarda da gelişen bu olayın, antifungal ilaçlara karşı direnç gelişiminde etkili olduğu belirtilmektedir (16). Opak hücreler beyaz hücrelere göre daha fazla eşeyli üreme eğilimindedirler, virulansları düşüktür ve deride kolonize olma kapasiteleri çok daha fazladır (17).

4) Salgısal Aspartil Proteinezlar (SAP): Enzim, *C.albicans* kökenlerinin çoğu tarafından ve daha az oranda *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis* kökenlerince üretilir. Proteinaz; serum albumini, ovalbumin, hemoglobin, jelatin, kollajen, laminin, fibronektin, Ig A, Ig G’nin Fc kısmı ve komplemanın C3 komponentini hidrolize ederek, başta *C. albicans* olmak üzere *Candida* kökenlerinin dokulara invazyon oluşturmalarını sağlar. *C. albicans* kökenlerinde, bu enzimleri kontrol eden SAP 1,2,3 genleri daha çok mukozal enfeksiyon oluşturan kökenlerde, SAP 4,5 ve 6 genleri ise sistemik enfeksiyon oluşturan kökenlerde ifadenmektedir (17). Pepstatin, proteinazın özgül bir inhibitörüdür ve *Candida* enfeksiyonlarını önleyici bir ajan olarak kullanılabilirliği ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir (9).

5) Fosfolipazlar: Maya ve hifal formadaki *C.albicans* kökenlerinin % 79'unda fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır. Özellikle membran fosfolipidlerini parçalayarak epitelyal hücrelere tutunmada bu enzimlerin rolü olduğu ve dolayısı ile virulansa katkıda bulundukları bildirilmektedir (9). Bu enzimler, özgül olarak kopardıkları ester bağlarına göre A, B, C ve D olarak sınıflandırılmaktadır. B en sık saptanan sınıftır ve hem hidrolaz hem de lizofosfolipaz transaçilaz etkinliklerine sahiptir. *Albicans* dışı *Candida* türlerinde de fosfolipaz varlığı tanımlanmıştır (17).

6) Not 5 proteini: CCR-NOT kompleksinde yer alan NOT 5 geni tarafından kodlanan bu proteinin, *C.albicans* kökenlerindeki bazı virulans faktörlerinin transkripsiyonunda düzenleyici role sahip olduğu saptanmıştır. Bu ürün, mantarın hif formuna geçişinden, sodyum dodesil sülfat (SDS) deterjanına direncinden ve insan yanak epitellerine tutunmadan sorumludur.

7) Slime faktör: Bir kısım mikroorganizmaların doğada saprofit hayatta ve insan vücudunda yaşamaya uyum sağladıklarında in vivo katı yüzeylere yapışma ve kalınlığı birkaç mm'ye varan hücre tabakalarından oluşan biyofilm oluşturma özelliklerinin bulunduğu, bu yapışmanın özgün olabildiği bilinmektedir. Biyofilm oluşumu kateter ve protez yüzeyinde enfeksiyona zemin hazırlamaktadır. Katater ve protez gibi yabancı cisimler organizmada fibronektin, fibrinojen, vitronektin veya laminin ile kaplanır. Maya hücreleri konağın bu matriks proteinlerine yapışabilirler. Hücre dışı polisakkaritler salgılandığında biyofilm oluşumu tamamlanır (12).

Biyofilm oluşumunda hifal yapıların, yapısal bütünlük ve çok katmanlılık açısından temel elemanlar olduğu belirtilmektedir. Bu süreçte Efg 1 düzenleyici proteini anahtar role sahiptir. Efg 1 üretmeyen mutant hücrelerin, blastosporlardan oluşan ve tek katmanlı, ince biyofilmler oluşturdukları gözlenmiştir. Biyofilm oluşumunda, mikrobiyal hücreler arasında sinyal iletişimi şart olup *Candida*'larda bu iletişim farnesol ve tirosol molekülleri ile sağlamaktadır. Farnesol filamentoz yapılaşmayı ve sonuçta biyofilm oluşumunu inhibe ederken; tirosol uygun koşullarda germ tüp ve filament oluşumunu teşvik etmektedir (9).

Candida biyofilmlerinin ilaçlara olduğu kadar, konak savunma mekanizmalarına karşı dirençte de rol aldığı ve bu nedenle klinik öneme sahip bir virulans faktörü olduğu kabul edilmektedir (9).

8) Ploidin: *C.albicans* diploid ve eşeyli çoğalmayı denetleyen MTL gen bölgesine sahip bir organizmadır. MTL alelleri açısından homozigot kökenlerde "White-Opaque" (WO) dönüşümü daha fazla görülmektedir. Virulansı düşük olan opak kökenlerde tetraploidlerin olduğu gözlemlenmiştir. Tetraploidlerin enfeksiyon baskısı altında karyotipik değişikliğe uğradığı gösterilmiştir. Anöploidi sürecinde ise gerek çoğalma hızındaki, gerekse virulans genlerinin düzenlenmesindeki yavaşlama, ploid ile, *C.albicans* kökenlerinin virulansı arasındaki bağlantıyı destekler (9).

9) Sideroforları Kullanabilme Yeteneği: Sideroforlar, demiri depolandığı dokudan veya transferrinden ayıran, hücre membranında yerleşmiş, düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. *Candida*'lar, üremeleri için gerekli olan demiri,

diğer *Candida*'lara ait sideroforlardan veya *Enterobacteriaceae* ailesinin sideroforlarından sağlayabilmektedir (18).

2.5. *Candida* Enfeksiyonlarında Bağışıklık Sisteminin Rolü

Candida'lar hem sıvısal, hem de hücresel bağışık yanıtı yol açarlar.

2.5.1. Hücresel Bağışık Yanıt

Polimorf nüveli lökositler, mononükleer hücreler ve lenfositler

Sağlam deri kutanöz kandidozuna karşı direnç sağlar ancak maserasyon, deriyi *Candida* invazyonuna duyarlı kılar. Maya hücresi dermise invazyon yapıp dolaşıma geçerse, polimorfonükleer lökositler (PNL) hem yalancı hücrelerde hasar oluşturur, hem de blastosporları fagosite ederler (9). PNL 'ler yani nötrofiller *C.albicans*'ın oluşturduğu sistemik enfeksiyonlara karşı çok önemli bir savunma faktörüdür. İn vitro deneylerde insan kanının *Candida*'yı öldüren bir aktivitesinin bulunduğu ve bunun doğrudan doğruya lökositlerden kaynaklandığı belirlenmiştir. PNL'lerin fungisidal mekanizmaları oksidatif ve non-oksidatif olmak üzere iki tiptedir. Oksidatif mekanizma nötrofilin bazı potent oksidanları sentez etmesiyle karakterlidir. Bu oksidanlar arasında, hidrojen peroksid, hidroksil radikalleri, hipoklorik asitler ve kloraminler sayılabilir. PNL'lerin hipoklorik asit ve kloramin sentezi, yine kendisinde bulunan miyeloperoksidaz (MPO) enzimi aracılığıyla olur. MPO, klorid iyonunun hidrojen peroksid tarafından oksidasyonunu katalize

eder. Özellikle, MPO ve hidrojen peroksit gibi fungusidal moleküller, PNL'lerin *C.albicans*'ı eradike edebilmesi için gereklidir. Buna karşın, diğer *Candida* türleri non-oksidatif mekanizmalar ile yok edilebilmektedir. MPO, normal insan PNL'sinin azürofil granüllerinde bulunur ve PNL mikroorganizmalarla karşılaştığında fagositik vakuollere ve hücre dışına salınır. Aynı enzim kan monositlerinde de bulunmakla beraber, makrofajlarda yer almaz (19).

Non-oksidatif mekanizma ise antifungal aktiviteye sahip protein ve peptidlerin varlığıyla açıklanmaktadır. PNL'lerin azürofil granüllerinde bulunan antimikrobik maddelerden defensinlerin *Candida* türlerine karşı aktivite gösterdikleri saptanmıştır. Bazı defensinlerin *C.albicans*'ı doğrudan öldürebildikleri belirlenmiştir. Yine aynı granüllerde bulunan katepsin G'nin de antifungal aktivitesi mevcuttur. PNL'lerin belirtilen kandidasidal etkilerine karşın, *C.albicans*'ın da PNL işlevlerini bozma ya da değiştirme yeteneği bulunmaktadır. Örneğin, *C.albicans*'ın ürettiği bir takım ürünler PNL'nin azürofil granül içeriklerinin salınmasını inhibe edebilmektedir. Altta yatana diğer bazı hastalıklar ve bunların tedavilerinin PNL fonksiyonları üzerinde olumsuz etkileri söz konusudur. Akut lösemilerde, geniş yanıklı hastalarda, solid tümör ya da lenfoma nedeniyle kemoterapi veya radyoterapi gören hastalarda PNL'lerin azalmış kandidasidal aktivite gösterdikleri saptanmıştır (19).

Eozinofiller de *Candida*'yı öldürürler (9). Monosit ve makrofajlar yani mononükleer hücreler (MN) ile ilgili çalışmalar ise, monositlerin oksidatif mekanizmalarla *Candida*'ya karşı savunma işlevini yerine getirdiğini göstermektedir (19).

Mannan, lenfosit yanıtını belirleyen en önemli yapısal komponenttir. Fakat lenfositlerin *Candida*'lara karşı savunmadaki rolü ve oluşan hücresel bağışıklığın önemi tam anlaşılamamıştır. Ancak, Kronik Mukokutanöz Kandidoz (KMK) ve AIDS'lilerin kutanöz kandidozunda hücresel savunma sistemindeki bozuklukların rolü açıktır. Hücresel yanıt sağlıklı kişilerde ve hastalarda saptanabilir. Bağışık yanıtın ölçülmesi amacıyla “geç tip aşırı duyarlılık deri testi” kullanılır. *Candida*'lara karşı yanıtta PNL ve MN, keratinositler, dendritik hücrelerin yanı sıra; yardımcı T hücresi (Th) kaynaklı yanıt da meydana gelir (20).

Kandidoz ve diğer mantar infeksiyonlarına karşı gelişen bağışık cevabın anlaşılması için kazanılmış bağışıklığın ve 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 (21).

Sitokinler

Uyarılmış lenfositler, monositler, makrofajlar ile diğer bazı hücrelerde sentezlenen ve salındıkları zaman, salındıkları hücre çevresindeki hücrelere (parakrin) veya salındıkları hücreler üzerine doğrudan (otokrin) etkili, çoğu 20-30 kD'luk bir grup potent peptid veya glikoprotein yapısındaki çözünür maddelere “sitokin” denmektedir. Monositler/makrofajlar tarafından salınan sitokinlere “monokin”, lenfositler tarafından salınan sitokinlere “lenfokin”, lenfokinlere etki edenlere “interlökin” denilmektedir (3).

Sitokinler, doğal ve kazanılmış bağışıklıkta rol alan, bağışık ve inflamatuvar olaylara katılan hücrelerin etkinliklerinin arttırılmasını sağlayan proteinlerdir. Hücreler arasında mesaj ileten biyolojik yanıt değiştiricilerdir (5). Sitokinler antijen için özgül değildir. Sentezlenmeleri ve hedef hücreleri etkilemeleri için çoğunlukla bir uyarı gerektirir; kendi aralarında agonist ve antagonist etkileşimler gösterebilir. Sitokin salgılanması kendini sınırlayıcı özelliktedir (3,5).

Antijen ve eş-uyaranlara yanıt olarak, T lenfositleri, özellikle CD4+ T hücreleri farklı etkilere sahip farklı sitokinler salgırlar. Sitokinler immünite ve enflamasyon mediyatörleri olarak fonksiyon gören geniş bir protein grubudur. Doğal bağışık yanıtlarda, sitokinler esas olarak makrofajlar tarafından üretilir, edinsel immün yanıtta ise sitokinler T hücreleri tarafından salgılanır. Bu proteinler bazı önemli özellikleri paylaşırlar, hatta farklı sitokinler farklı etkilere sahiptir ve immün yanıtlarda farklı roller üstlenebilirler.

Interlökin 1 (IL-1)

IL-1, T hücrelerinin antijenik uyarımı esnasında mononükleer fagosit hücreler tarafından salgılanır. Polipeptid yapıda olan bu sitokin T hücreyi yardımcı uyarandır. (Co-stimulator)

IL-1, T hücrelerinin antijeni tanıma uyarımı ile salgılandığı gibi, TNF gibi lipopolisakkarid etkisiyle de salgılanır. IL-1 endotel ve epitel hücreleri tarafından da salgılanır.

IL-1 β ve α olmak üzere iki polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Dolaşımında en çok IL-1 β bulunmaktadır (22).

IL-1 reseptörü pek çok hücrede bulunur. IL-1 sitokini, T hücresindeki reseptöre bağlandığında IL-2 gen transkripsiyonunu başlatır.

IL-1, düşük yoğunlukta olduğunda CD4⁺ T hücresinde çoğalma, B hücresinde gelişme ve farklılaşma etkisi gösterir. T lenfosit dışında mononükleer fagositleri ve damar endotel hücrelerini etkileyerek IL-1, IL-6 ve IL-8 salgısına yol açar.

IL-1 de TNF gibi koaglütinasyonu ve damar endoteline lökosit adezyonunu artırır. Eğer yüksek dozda salgılanır ise kan dolaşımına geçer, endokrin etki gösterir. Bu etki TNF gibi ateş, akut faz protein sentezine ve kaşeksiye yol açar. IL-1 ve TNF etkileri birbirine benzemesine rağmen bazı farklar vardır. Örneğin IL-1 doku zararı yapmaz ve gene çok yüksek dozlardaki IL-1 öldürücü değildir. IL-1 yalnız başına “Shwartzman olayı” ile tümör dokusunda hemorajik nekroz yapmaz. Ayrıca IL-1, TNF gibi MHC molekül yapımını arttırmaz (23).

Interlökin 2 (IL-2)

IL-2 daha önce T gelişme faktörü (T Cell Growth Factor, TGGF) olarak bilinmekteydi. Bu sitokin, T lenfositleri gelişmesinde en etkili sitokindir, T hücresinin G1'den S fazına geçmesinde etkilidir. IL-2 hem otokrin, hem de parakrin özelliktedir yani kendi salgılandığı hücreye ve yakınındaki T hücrelerine

etki yapar. Büyük çoğunlukla Th hücreleri tarafından çok az da CD8+ T hücreleri tarafından salgılanır.

T hücresi uyarımında 24 saat sonra IL-2 salgısı en fazla noktaya ulaşır. IL-2 kendi salgılamasına ilaveten gama-IFN ve lenfotoksin (LT) salgılamasını da uyarır. IL-2 salgısı T lenfosit yüzeyindeki IL-2 reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterir. IL-2, NK hücresi gelişmesine de etki yaparak sitolitik aktivitesini artırır. Bu şekilde IL-2 ile aktive olmuş NK hücresine “lenfokin ile aktive olmuş killer (LAK) hücresi” adı verilir.

IL-2, B hücresi gelişmesini de etkiler ve antikor sentezi uyarımı yapar (23).

Interlökin-4 (IL-4)

Diğer adı B hücre büyüme faktörüdür (22). IL-4, Th hücresi tarafından salgılanır, istirahat halindeki B hücresini uyarır. IL-4, B hücresinde MHC sınıf II molekülünün sunulmasını da artırır. IL-4, B hücresi gelişme ve farklılaşma faktörü olarak etki yapar, aynı zamanda Ig E sentezi için sinyal faktörü olarak da etki gösterir. IL-4, Th hücresi için otokrin etki gösterir, IL-4, IL-5 ve IL-6 salgısını da artırır (23).

Interlökin-6 (IL-6)

IL-6, IL-2 ve daha az olarak TNF etkisiyle MN fagosit, damar endotel, fibroblast ve diğer hücrelerden salgılanır. IL-6, hepatositlerde fibrinojen gibi bazı plazma proteinleri sentezine yol açar (23).

IL-6, aktive B hücrelerine, geç dönemde B hücre farklılaşmasında gelişme faktörü olarak etkiler.

IL-6, T hücresi ve timositlere ko-stimulatör etki yapar, kemik iliğinde de hematopoetik kök hücrelerinin gelişmesinde etkilidir.

Interlökin-10 (IL-10)

Diğer bir adı sitokin sentezi inhibitör faktörüdür. Th2 hücreleri, B lenfositleri ve makrofajlar tarafından antijen ve bakteriyel ürünlerce uyarıldıktan sonra geç dönemde salgılanır. Th1'lerin üreteceği IL-2 ve IFN- γ yapımını baskılar, bu sayede bağışık yanıt Th2 yönünde gelişir.

Makrofajlara ve antijen sunucu hücrelere MHC sınıf 2 ifadenmesini azaltıcı yönde etki eder. Aktive makrofajlardan ve dendritik hücrelerden IL- 12 salınımını inhibe ettiği için negatif “feedback” mekanizmasına iyi bir örnek oluşturur (4).

Interlökin 17 (IL-17)

Th17 lenfositler tarafından üretilir ve esas hedefi epitelyum, fibroblastlar ve endoteldir. IL-6 salınımı, G-CSF, PGE2, ICAM-1 artışı, CD34+ öncüllerin canlılığı için fibroblastların uyarımı gibi görevleri vardır (24).

Interferon γ (IFN- γ)

IFN- γ 'nın diğer adı immün interferondur. T hücresi, antijen uyarımı sonucu ve IL-2 etkisiyle IFN- γ salgılar. T hücresi dışında az miktarda NK hücresi tarafından da salgılanır. Etkisi immün yanıtın düzenlenmesi üzerinedir. Kuvvetli bir mononükleer fagosit aktivatörüdür. Aktive makrofajların mikrop öldürücü ve tümör öldürücü etkisini çok artırır.

Mononükleer fagositleri aktive eden sitokinlerin hepsine makrofaj aktive eden faktörler (MAF) denir. IFN- γ , önemli MAF'lardandır.

Tümör Nekroz Faktör- α

Konak organizmanın gram negatif bakterilere karşı bir yanıtı olarak TNF salgılanır. TNF, mononükleer fagosit hücreler tarafından salgılanır. Gram negatif bakterilerin aktif bir hücre duvarı maddesi olan lipopolisakkarit (LPS) (endotoksin) uyarımı ile salgılanan TNF'e, tümör dokusunu nekroze eden özelliği nedeniyle bu isim verilmiştir.

TNF, IL-1 ile beraber endojen pirojen olarak ateş yükselmesine neden olur. IL-1ve IL-6 salgısını arttırır. Damar endotellerinin prokoagülan ve antikoagülan aktivitesindeki dengeyi bozarak koagülasyon sisteminde bozukluklara neden olur. Kemil iliği üzerine baskı yaparak, lenfopeni ve immün yetmezlik meydana getirir. Kaşeksiye yol açar.

Transforming Growth Faktör- β (TGF- β)

Belirli tümör hücrelerinin bir salgısı olarak bulunmuştur. TGF- β 'in etki şekli değişkendir, birçok hücrenin gelişmesini önler, diğer bazı hücreleri ise stimüle eder. Anjiyogeneze neden olur.

TGF- β lenfositler üzerinde inhibisyon etkisi gösterir. TGF- β bir anti-sitokin etkiye sahiptir, immün yanıtı durduran bir faktördür.

Sitokin salınımının ölçülmesi:

Sitokin salınımının ölçülmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), ELISPOT (The Enzyme linked immuno sorbent spot), RT-PCR (Revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu), immuno histokimyasal ve intra sellüler sitokin boyama (ICSS) olarak sayılabilir. Bu sistemlerin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. ELISPOT ve ICCS sitokin üreten hücrelerin frekansını tahmin etmede en uygun yollardır. ELISA salgılanan proteinin tüm miktarını ölçer. RT-PCR yarı kantitatif

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Kromojenik substratlarıyla birleşmesiyle renk değişimi olur. Son yıllarda Konjugatı işaretlemek için enzimlerin kullanıldığı yöntemler ELISA ya da EIA (enzyme immunoassay) olarak adlandırılırlar. Günümüzde birçok tanı laboratuvarında yaygın olarak kullanılan ELISA testlerinin avantajları;

- Geniş enfeksiyon tanı parametrelerinin ticari olarak kolayca elde edilebilmesi,
- Yöntemin otomasyona uyarlanabilirliği ve böylece çok sayıda örneğin kısa sürede çalışılabilmesi,
- Sonuçların spektrofotometrede objektif olarak değerlendirilebilmesidir.

Katı Faz (Matriks): Çukurlarına antijen veya anikor bağlanmış olan 96 çukurlu mikropklardır.

Enzim ve Substratlar: Konjugatların işaretlenmesinde en sık kullanılan enzimler alkalen fosfataz (AP) ve “horseradish peroksidaz” (HRP) enzimleridir. AP için kullanılan substrat BCIP/NBT, HRP için kullanılan ise TMB’dir. Bu enzimlerin işaretleme maddesi olarak biotin-avidin sistemleri kullanılarak, bağlanmanın daha kuvvetli ve özgül olması sağlanmıştır (26). Yıkama: ELISA yönteminde her bir basamak arasında fosfatlı tampon solüsyonu ile yıkama işlemi önemlidir. Bu işlem, özgül bağlanmaları etkilemezken, özgül olmayan bağlanmaları giderir.

Durdurma: ELISA’nın son safhası olan “reaksiyonun durdurulması” basamağında asidik veya bazik çözeltiler kullanılır. Bu işlemin yapılamaması ya

da geç yapılması, kromojenik substratın bir süre sonra özgül olmayan renk değiştirmesine, dolayısıyla da geçersiz sonuçların elde edilmesine yol açar.

Okuma: Reaksiyon sonunda oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülür.

ELISA Yönteminin Uygulanması

- 1) Katı faza bilinen bir antijen/antikor bağlanır.
- 2) Antijen/antikor bağlı çukurlara örnekler ve standartlar eklenerek oda ısısında veya 37°C' de belirli bir süre bekletilir.
- 3) İnkübasyon sonunda çukurlara eklenmiş olan örnekler dökülerek kuyucuklar tamponlanmış sıvı ile yıkanır. Çukura eklenen örnekler içinde özgül antikor var ise katı fazdaki antijene bağlandığı için yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırılmaz.
- 4) Katı fazdaki antijene bağlanmış olan IgG yapısındaki antikoru saptamak amacı ile çukurlara Fc kısmı enzim ile işaretili anti-IgG antikoru eklenir. (IgM yapısındaki antikoru saptamak için ise üzerine enzimle isaretili anti-IgM antikoru eklenir). Enzim ile işaretili anti-IgG antikorları konjugat olarak tanımlanmaktadır.
- Çukurlara konjugat eklendikten sonra plak belirli bir süre bekletilir. İnkübasyon sonunda çukurlara eklenen konjugat dökülür, tamponlanmış sıvı ile yıkanır.
- 6) Yıkama işlemi sonunda ortamda bağlı kalan konjugatın gösterilmesi amacıyla çukurlara konjugattaki enzime uygun substrat eklenir. Ayrıca reaksiyonun görünür hale gelmesi için kromojen içeren karışım eklenir.

7) ukurlara eklenmiş renksiz enzim substratı belirli bir süre sonrasında konjugattaki enzimin etkisiyle renklenir.

8) Enzim aktivitesini durdurmak amacı ile H₂SO₄ eklenir ve oluşan rengin koyuluğu ELISA okuyucusunda değerlendirilir. Plaktaki bazı çukurlara miktarı bilinmeyen standart antikor eklenirse, bu çukurlardan elde edilen optik dansite (OD) eğrisi ile içeriği bilinmeyen örneklerdeki antikor miktarı saptanabilir.

ELISA ile Antijen Tespiti:

a- Yarışmasız (non-competitive) Yöntem:

- Araştırılacak olan antijene özgül antikorlar mikropalak çukurlarına bağlıdır. Hasta klinik rneği çukurlara eklenir. Antijen varsa antikorla özgül olarak birleşir.
- İnkübasyon ve yıkama işlemleri yapılır.
- Çukurlara antijene özgül, enzimle işaretlenmiş antikor eklenir.
- Yıkama yapılır.
- Durdurma solüsyonu eklenip, reaksiyon sonlandırılır.
- Spektrofotometrede okutulup, absorbans değeri saptanır.

b- Yarışmalı (competitive) Yöntem:

- Çukurlara zgl antikor bağlıdır. Antijen araştırılacak olan hasta rneği ile birlikte aynı anda enzimle işaretli antijen eklenir.
- İnkübasyon ve yıkama işlemlerinden sonra kromojenik substrat eklenir.

- Çukurlara konjugat eklendikten sonra plak belirli bir süre bekletilir.
- İnkübasyon sonunda çukurlara eklenen konjugat dökülür, tamponlanmış sıvı ile yıkanır.

ELISA ile Antikor Tespiti:

- Özgül antijen bağlı çukurlara hasta serum dilüsyonları eklenir. Özgül antikor varsa antijenle birleşir.
- İnkübasyon ve yıkama işleminden sonra araştırılan antikora özgül konjugat eklenir.
- İnkübasyon ve yıkama sonrası, kromojenik substrat eklenir.
- Spektrofotometrede absorbansı saptanır.
- Reaksiyon sonucu oluşan renk değişikliği hasta serumundaki antikor miktarıyla doğru orantılıdır.

Hücresel bağışık yanıtın mekanizması

Aktive olan CD4⁺ T lenfositleri çoğalır ve olgun Th0 lenfosit halini alır. Bu hücreler, gelecek bağışık yanıtı göre IL-2 ve IFN- γ salgılayan Th1 hücrelerine veya IL-4, IL-5 salgılayan Th2 hücrelerine farklılaşır (27). Th0 hücreleri IL-12 varlığında Th1, IL-4 varlığında Th2'ye dönüşür. Th0 hücrelerinin Th1 ve Th2 hücrelerine farklılaşması TGF- α ve anti-IFN- γ antikorlarla önlenabilir. Son yıllarda Th2 hücrelerinin IL-12 etkisi altında Th1 fenotipine dönebilecekleri gösterilmiştir (28).

Th1 yanıtı, genellikle infeksiyonun erken evresinde lokal bir yanıt olarak meydana gelir; inflamatuvar sitokinlerden IFN- γ , IL-2, IL-12'nin üretimlerinin

artısı 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 arttırdığı düşünülmektedir. Viral infeksiyonlara ve hücre içi patojenlere karşı savunmayı oluşturur. Bu hücreler hücrel bağışık yanıtın oluşmasında etkin rol oynar (22).

Th2 yanıtı, lenf nodlarında antijenin B lenfositleri, dendritik hücreler veya makrofajlarla sunulması sonucu genellikle geç gelisen bir bağışık yanıttır. Th2 hücreleri tarafından salgılanan sitokinler de; B hücre farklılaşması, immunoglobulin (Ig) sınıf seçimi, hafıza B hücreleri ve plazma hücrelerinin oluşumunu uyarmaktadır. Th2 hücreleri tarafından salgılanan sitokinler; IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, TGF- β gibi sitokinlerdir. Th2 hücreleri, IL-4 ile uyarılırken, IFN- γ ile baskılanmaktadır (3,4). 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. Ayrıca Th2 hücreler, B hücrelerini, IgM, kompleman fiske etmeyen IgG4 ve IgE sentezine yöneltir. Dolayısıyla, bu hücreler, akut ve kronik inflamasyonu ve geç tipte hücrel aşırı duyarlılığı inhibe eder. Bu hücreler Th1 hücrelerinin aksine CD30 yüzey reseptörü ve kemokin reseptörü (CCR3) taşır (22). IL-3 ve GM-CSF gibi bazı sitokinler hem Th1 hem de Th2 hücreleri tarafından salgılanır.

Fungal infeksiyonlara karşı primer koruyucu yanıt Th1 aracılı inflamatuvar reaksiyonlarla gerçekleşir. Bu yanıtın eksik olduğu hastalar fungal infeksiyonlara

duyarlıdır. Th1 yanıtının kandidoza karşı koruyucu etkisi olduğu, Th1 yanıtının Th2 yanıtına baskın olduğu düşünülmektedir (24).

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 sınıf 2 antijenlerine bağlanarak, MHC-peptid kompleksi şeklinde hücre yüzeyine sunulur ve spesifik CD4⁺ Th lenfositleri tarafından tanınır. 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 (29).

C.albicans’a karşı savunmada TLR2 ve TLR4’ün önemi gösterilmiştir. TLR2, makrofajlardan *C. albicans* aracılığı ile TNF- α salgılanması için gerekli bir moleküldür. TLR2’ye spesifik antikorlar, insan mononükleer hücrelerinde *C. albicans*’ın uyardığı TNF- γ ve IL-1 salınımını inhibe eder (4).

2.5.2. Sıvısal bağışıklık

Mayanın nötrofiller tarafından yutulmasında IgG sınıfından opsonik antikorların rolü vardır. Serum IgG yanıtı, dissemine kandidozda yükselme gösterir. Kompleman fraksiyonu olan C3b, opsonin olarak *C.albicans* blastosporlarına bağlanabilir. *Candida*’lara karşı her sınıftan antikor yanıtı gerek invazif gerek kutanöz tutulumlu hastalarda ve gerekse normal sağlıklı kişilerde

saptanabilir. Baskın bir *Candida* antijeni olan HSP 90 (ısı şok proteini 90) ve lipozomal mannan-protein kompleksi ile hayvanlarda yapılan aşı çalışmalarında başarılı sonuçlar alınmıştır (9).

2.6. *Candida* Türlerinin Neden Olduğu Enfeksiyonlar

Candida türleri, mukozal kolonizasyondan çoklu organ tutulumuna kadar çeşitli enfeksiyonlara yol açabilirler. *Candida* enfeksiyonlarının klinik yansıması kutanöz/ mukokutanöz enfeksiyonlar, kronik mukokutanöz kandidoz ve sistemik kandidoz olmak üzere üçe ayrılabilir. Mukokutanöz enfeksiyonlar; oral kandidoz, özefagus kandidozu, özefagus dışı gastrointestinal kandidoz, vulvovajinal kandidoz ve kutanöz kandidoz tablolarını içerir. Sistemik kandidoz ise kandidemi, akut yaygın kandidoz, kronik yaygın kandidoz ve çeşitli organ sistemlerinin tutulumunu içeren derin organ kandidozundan oluşmaktadır (13).

2.6.1. Kutanöz ve Mukozal Kandidoz:

Oral Kandidoz: dört farklı klinik formda gelişmektedir.

Akut pseudomembranöz kandidoz: En sık olarak yenidoğanlarda *C.albicans*'ın ağızda kolonize olması ile karakterize olan tablodur. Yenidoğanlar dışındaki konaklarda anatomik defekt, poliendokrin bozukluklar, kanser, KOAH veya astım gibi başka hastalıkların bulunması, steroid inhalasyonu, immün

yetmezlik tabloları ve HIV enfeksiyonu gibi predispozan faktörler etkili olmaktadır (30).

Lezyonlar yanak mukozası, dişeti ve dilde beyaz yama tarzı plaklar şeklinde ve ağrısızdır. Bu bölgelerden yapılan histopatolojik incelemede nekrotik materyal, bakteri, lökosit, yalancı hif ve maya hücreleri görülür (31).

Akut atrofik kandidoz (glossodynia): Sıklıkla geniş spektrumlu antibiyotik sağaltımının bir komplikasyonu olarak gelişmektedir. Oral mukozanın herhangi bir kısmı etkilenebilir. Dil tutulursa papillalar silinir, dil parlak bir şekil alır. Ağızda hassasiyet mevcuttur.

Kronik atrofik kandidoz (denture stomatit): Genellikle ağız protezleri ile ilişkilidir. Asemptomatik seyreder. Özellikle sert damakta kronik eritem ve ödem oluşur.

Kronik hiperplastik kandidoz (lökoplaki): Malign transformasyon göstermesi nedeniyle önemli bir tablodur. Hiperplastik lezyonun *C. albicans* ile süperenfeksiyonu da olabileceğinden bu konu tartışmalıdır. Sıklıkla yanaklar daha az olarak da dil tutulmaktadır. Lezyonlar kırmızı ve beyaz karışık plaklar şeklinde olduğunda malign transformasyon düşünülmelidir (32).

Özefagus Kandidozu: *Candida* özefajiti en sık disfaji, odinofaji ve retrosternal ağrı semptomlarına yol açar. Bu tablo % 60'ın üzerinde oral kandidoz ile birlikte seyreder.

Vajinal Kandidoz: Kadınların %75'inden fazlası hayatlarında en az bir kez bu enfeksiyonu geçirmişlerdir. Vajinal kandidozların en sık etkeni *C.albicans*'tır. İkinci sıklıkta *C. glabrata* görülmektedir. Vajinal kandidoza predispozisyon

yaratan faktörler arasında gebelik, diyabet, sentetik çamaşır kullanımı, antibiyotik sağaltımı ve oral kontraseptif kullanımı sıralanabilir. Ancak yine de olguların % 50'sinden fazlasında bilinen bir predispozan faktör belirlenememektedir. Vulva ve vajinada kaşıntı, yanma, kızarıklık temel bulgulardır. Vulvada eritem ve fissürler, vajinada kalın beyaz adheran plaklar bulunur. Buradan yapılan histopatolojik incelemelerde maya ve yalancı hifler epitel içinde görülebilmektedir (32,33).

Penil Kandidoz: İlk kez 1920'de Engman tarafından tanımlanan bir klinik tablodur. Daha çok balanit ya da balanopostit şeklinde görülmektedir. Glans penisde ağrılı, eritemli lezyonlar olup prepusyum altında *Candida*'lar kolonize olabilir. En sık etken *C.albicans*'tır (30,32).

Deri kandidozu: Derinin daha çok aksilla, meme altı, anüs çevresi, el ve ayak parmak araları gibi sıcak ve nemli kat yerlerinde görülür. Şişmanlık, diyabet, travma veya maserasyon predispozan faktörlerdir (2). Lezyonlar veziküller, püstüller ve düzensiz sınırlı eritematöz alanlar şeklinde görülmektedir. Histopatolojik olarak dokularda hücre içi maya hücreleri ve hif yapıları gösterilebilmektedir (30,32,34).

Tırnak Kandidozu: Onikomikoz vakalarının % 5-10 nedeni *Candida* enfeksiyonlarıdır. En sık etken *C.albicans* olup *C.krusei* ve *C.guilliermondii* diğer sık görülen türlerdir. Paronişya (tırnağın paroksimal tutulumu), distal tırnak enfeksiyonu ve kronik mukokutanöz kandidoz olmak üzere üç formu bulunmaktadır. El tırnakları, ayak tırnaklarına göre daha fazla tutulmaktadır (32).

2.6.2. Kronik Mukokutanöz Kandidoz (KMC)

Genelde konjenital, immunolojik ve endokrinolojik bozukluklar ile birlikte bulunan tekrarlayıcı mukoza, deri ve tırnak enfeksiyonları için kullanılan bir tanımlamadır. Sıklıkla yaşamın ilk 3 yılında görülmektedir. Kişilerde T lenfosit aktivasyonu bozulmuştur. Makrofaj aktivasyonu için gerekli T hücre faktörlerinin üretimi normalin altındadır. Lökosit fonksiyon bozuklukları, timus disgenezi ve agamaglobulinemi birlikte bulunabilir. KMC ile ilişkili patolojiler sınıflandırılmıştır;

1. Kronik oral kandidoz
2. KMC ve poliendokrinopati
3. Lokal KMC
4. Diffüz KMC
5. Timoma ile ilişkili KMC
6. İnterstisyel keratit ile KMC
7. KID (keratit, iktiyozis, sağırlık) ile ilişkili KMC

2.6.3. Sistemik Kandidoz

Kandidemi: Klinik olarak enfeksiyon belirti ve bulguları olan bir hastada en az bir kan kültüründe bir *Candida* türünün izole edilmesi kandidemi olarak tanımlanır. Genel durumu düşkün, üremik veya yüksek doz kortikosteroid tedavisi

alan hastalarda klinik belirti ve bulgu olmadan kandan *Candida* izole edilmesi anlamlı kabul edilmelidir.

Katetere bağlı kandidemi: Günümüzde, intravasküler kateteri olan bir hastada gelişen kandidemi, dikkatli bir klinik ve laboratuvar değerlendirmeden sonra başka bir enfeksiyon odağı saptanmıyorsa katetere bağlı kandidemi olarak kabul edilmektedir. Fungeminin kaynağı kateter ise, kateterden alınan kan örneğinin kantitatif kültüründe üreyen *Candida* türünün sayısı, aynı anda periferik başka bir damardan yapılan kantitatif kan kültüründe üreyen *Candida* sayısının en az on katıdır. Rutinde yapılan non-kantitatif kateter ucu kültürlerinin tanıda değeri yoktur.

Akut Dissemine Kandidoz: Birbirine komşu olmayan organların *Candida* türleriyle enfekte olması, dissemine enfeksiyonun kan yoluyla geliştiğini gösterir. Tanı için, en az bir iç organda klinik, patolojik veya kültürle kanıtlanan *Candida* enfeksiyonu olmalı, bununla birlikte bir başka iç organda da histopatolojik olarak veya kültürle *Candida* gösterilmelidir. *Candida*'ya bağlı çok sayıda deri lezyonları veya oftalmit ile birlikte kandidemi saptanması, dissemine enfeksiyonu gösterir (35). Yenidoğanda klinik tablo bakteriyel sepsise benzer ve enfeksiyon hızla yayılır; olguların üçte ikisinde deri ve santral sinir sistemi, yarısında retina tutulumu izlenir. Bebeklerin % 70'inde solunum fonksiyonunda bozulma ve apne saptanır.

Erişkinde tipik olgu, yoğun bakım ünitesinde yatan nütropenik olmayan hasta ya da kemoterapiye bağlı nütropeni gelişmiş hematolojik maligniteli hastadır. En sık rastlanan semptom, antibakteriyel ilaçlara yanıt vermeyen ateştir.

Enfeksiyon çeşitli organ sistemlerine yayılır. Oftalmik tutulum, hasta popülasyonuna (nötropenik hastada inflamatuvar yanıtın yetersizliği nedeniyle daha düşük oranda), araştırmanın prospektif ya da retrospektif niteliğine, tanı kriterlerine, muayene sıklığına ve muayene eden doktora bağlı olarak % 3-78 olarak bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan prospektif araştırmalarda, retina tutulumunun hastalığın seyri sırasında da gelişebileceği gösterilmiştir. Bu nedenle oftalmik muayene tanı sırasında yapılmalı ve tanıdan iki hafta sonra tekrarlanmalıdır (36).

Candida'ya bağlı çok sayıda deri lezyonları nötropenik hastada miyaljiyle birlikte % 10-15 oranında saptanmaktadır. Bu lezyonlar, pembe nodüller, ektima gangrenozum veya ilaç erüpsiyonuna benzer döküntüler şeklinde olabilir (37).

Damar içi uyuşturucu kullananlarda ise organ tutulumu özellik gösterir. Kontamine uyuşturucu solüsyonunun enjeksiyonuyla gelişen enfeksiyon, birkaç saatten bir aya kadar değişebilen ateş, titreme, terleme, halsizlik veya baş ağrısıyla seyreder (38).

Kronik dissemine kandidoz: Hepatosplenik kandidoz olarak da bilinen kronik dissemine kandidoz, uzun süren nötropeniden çıkan kanser hastalarında görülen bir klinik tablodur. Ancak olayın karaciğer ve dalakla sınırlı olmaması nedeniyle hepatosplenik kandidoz terimi doğru değildir. Enfeksiyon uzun süre nötropenik kalan hastada, yani akut lösemi, miyelodisplastik sendrom ve aplastik anemili hastalarda daha sık gelişir. Bu enfeksiyon;

1. Geniş spektrumlu antibakteriyel tedaviye karşın ateşin devam etmesi, nötropeni düzeldikten sonra da ateşin olması,

2. Üst kadranda ağrı veya hassasiyet, sarılık, hepatomegali ve/veya splenomegali gibi abdominal belirti ve bulgular,
3. Karaciğer fonksiyon testlerinde, özellikle serum alkalen fosfatazda yükselme,
4. Abdominal görüntülemelerde kronik dissemine kandidoz ile uyumlu radyolojik bulgular,
5. Histopatolojik incelemede veya infekte doku ya da kan kültüründe *Candida* türünün izole edilmesiyle karakterizedir. Histopatolojik veya kültür sonucunun olmayışı kronik dissemine kandidoz tanısını olası kılar (10).

2.7. Kandidozda Tanı

Mantar enfeksiyonlarının laboratuvarında tanısının konması tümüyle klinik örneğin uygun alınmasına ve laboratuvara en uygun ve en hızlı şekilde ulaştırılmasına bağlıdır. Tanı için en olası etkene göre örnek alınması zaman ve kaynak israfını önleyebilir. *Candida* enfeksiyonlarının tanısı için alınacak örnekler olarak kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), idrar, aspirat, solunum yolu örnekleri, doku biyopsi örnekleri, ağız ve vajen sürüntü örnekleri, saç-tırnak-deri kazıntı örnekleri sayılabilir (39).

1-Direkt Mikroskopi: Direkt örnekte mantar elemanları görülmesi, kliniğe hızlı bir ön bilgi verilmesini sağlayacaktır. Bazı koşullarda, sadece direkt örnekte

mantar elemanlarının görülmesi tanı için yeterlidir. Kültür sonucu beklenmeden, tedavi düzenlenebilir.

Bu amaçla ıslak preparat hazırlanabildiği gibi % 10-20'lik KOH, Gram, metilen mavisi, Wright, Giemsa, kalkoflor beyazı, periyodik asit-schiff (PAS) ve methenamin gümüş boyası ile hazırlanan preparatlar kullanılabilir. *Candida* türleri dokuda en iyi PAS ve methenamin gümüş boyası ile gösterilmektedir. KOH, kalın mukoit ve saç, deri, tırnak gibi keratinize örneklerden *Candida* türlerinin ayrıştırılmasını sağlamaktadır. Hazırlanan KOH preparatında tomurcuklanan blastosporların yanında yalancı hiflerin görülmesi, tanıda kültürden daha değerlidir. Direkt incelemede KOH veya KOH ile birlikte *Candida* hücre duvarındaki kitine bağlanma özelliği gösteren kalkoflor beyazının kullanılması duyarlılığı arttırmaktadır (13).

Hazırlanan boyalı direkt preparatlarda tomurcuklanan maya hücreleri, yalancı ve gerçek hif yapıları aranır. Yalancı ve gerçek hif yapılarının görülmesi dokuya invazyonun yani enfeksiyonun göstergesi olarak kabul edilir (40).

2-Kültür: Tüm örnekler antibiyotikli Sabouraud-dekstrozu-agar gibi rutin bir besiyerine ekilerek oda ısısında ve 37°C'de inkübe edilirler. *Candida* türleri genellikle 24 saat içinde koloni oluştururlar, ancak 48 saatte kolonileri daha belirginleşir. Oluşan kolonilerden preperasyon yapılarak organizmanın maya olup olmadığı kontrol edilir. Daha sonra mayanın saf kültüründen mısırunu-Tween 80 besiyerine ekim yapıp yalancı hif ve /veya gerçek hif yapıp yapmadığı, blastokonidyumların büyüklüğü, şekli ve dizilimleri, ayrıca kökenin klamidiospor

oluşturup oluşturmadığı saptanır. Pratik olarak, *C.albicans* germ tüp testi pozitifliği ve mısırunu-tween 80 agarda tipik klamidosporları ile tanınır.

3- *Candida* 'ların İdentifikasyonu:

Çimlenme borusu (germ tüp) testi: Kültürde üreyen maya kolonilerinin tanımlamasında uygulanacak ilk yöntem çimlenme borusu testidir. Bu test; klinik örneklerden soyutlanan mayaların yaklaşık olarak % 75'ini oluşturan *C. albicans*'ın, diğer *Candida* türlerinden ayrılmasını sağlayan hızlı ve kolay bir testtir. *C.albicans* ve *C.dubliniensis* çimlenme borusu oluşturan mayalardır. Bazen *C.tropicalis* de çimlenme borusu benzeri bir yapı oluşturabilir (41).

Morfolojik özelliklerin değerlendirilmesi: Mısır unu-tween 80 agar, pirinç özütü tween 80 agar gibi besin açısından fakir ortamlar, lam kültürü yöntemi ile *Candida* türlerinin morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesini ve bu yolla da türlerin birbirinden ayırt edilmesini sağlar. Bu yöntemle mayaların oluşturdukları gerçek ve yalancı hifler, blastokonidyalar, klamidosporların yapı ve yerleşimlerine göre tür düzeyinde tanımlamaya gidilir (13).

Peptit Nükleik Asit- Floresan In Situ Hibridizasyon Metodu (PNA-FISH), Üreaz Testi, Hızlı Trehaloz Testi, Kromojenik Besiyerleri ile İdentifikasyon, Karbonhidrat Asimilasyon Testleri, Karbonhidrat Fermentasyon testleri ie de tür tanımına gidilebilir.

4-Serolojik Testler: Hücre duvarı mannan ve mannoproteinlerinin invaziv kandidoz olgularının tanısında kullanımı ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur. Sağlıklı konakta, anti-*Candida* antikorları bu maddelerin tanımlanabilmesini olanaksız hale getirir ve serumda ölçülebilir miktarlarda bulunan mannan antijenleri serumdan hızla temizlenir. Bağışık sistemi baskılanmış hastalarda invaziv kandidoz ile kolonizasyonun ayrımı yapılabilmektedir. Geçici ve kateter ile ilişkili kandidemilerde invaziv *Candida* enfeksiyonlarına göre düşük miktarda antijen bulunmaktadır.

C.albicans mannoproteininin hücre duvarı ekstrelerine karşı oluşan antikorları belirleyen bir testte mevcuttur. Bu testin duyarlılık ve özgüllüğü yüksektir.

Sitoplazmik antijenler de kandidoz için tanısal ve prognostik gösterge olarak kullanılmıştır.

Candida'ların hücre duvarı antijenlerinden β -(1-3)-D-glukan invaziv kandidozda yüksek konsantrasyonlarda bulunmakla beraber, türe özgü ayırım yapamamaktadır.

İnvaziv kandidoz tanısında *Candida* metaboliti olan arabinitolün serumda gösterilmesi hematojen yolla yayılmış kandidoz göstergesi olarak kabul edilebilir (39).

5-Moleküler yöntemler: Son on yılda mantarların filogenetik bilgisinde büyük bir genişleme olmuştur. Yapılan ilk moleküler tanımlama çalışmaları olan ribozomal DNA tekrar bölgesinin 'restriction fragment length polimorphism (RFLP)' analizi yapıldığında *Candida* türlerinin farklı büyüklükte bantlar oluşturduğu gösterilmiştir. Daha sonraları işaretlenmiş DNA problemlerinin

kullanıldığı ‘Southern blot’ yöntemi ile RFLP’nin duyarlılığı arttırılmıştır. 1990’dan itibaren ise polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çok küçük miktardaki DNA’nın çoğaltılabilmesi ve agaroz jelde görülebilmesi mümkün olmuştur. 2000’li yılların başından itibaren geliştirilen floresan işaretli probaların özgül DNA’ya bağlandıklarında çıkan enerjiyi ölçen cihazlar kullanılmaya başlanmıştır. Gerçek zamanlı PCR ile örnekteki fungal yük miktarı belirlenebilmektedir (42).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR): Kan, serum, BOS ve diğer klinik örneklerde *Candida* DNA’sının tespit edilmesi için çok sayıda PZR temelli yöntem geliştirilmiştir. *Candida* genomu üzerinde farklı bölgeler hedef olarak denenmiştir. Ancak, en verimli sonuçlar ribozomal DNA gen bölgesi ile elde edilmiştir. Moleküler tanı yöntemleri ile dokuda veya vücut sıvısı örneklerinde *Candida* enfeksiyonu hızlı bir şekilde gösterilmektedir. . Tek turlu PZR, iki turlu PZR yöntemleri geliştirilmiştir. Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile oluşan amplifikasyon sinyali eş zamanlı olarak izlenmekte ve sonuç hızla alınmaktadır. Son yıllarda etkene yönelik PZR yerine bütün mantarlarda ortak olan bölgelerin hedeflendiği “panfungal” PZR yaklaşımı kabul görmektedir. Kan ve serum kısmen invaziv olmayan yöntemlerle elde edilebilmeleri nedeniyle sistemik mantar enfeksiyonlarının tanısında potansiyel olarak kullanışlı örneklerdir. Ancak kanda organizma yükü çok düşük ve geçici olabilir ve 5 ml klinik örneğin 4-5 litre olan vücut kanını tam olarak gösterebildiğini söylemek zordur. Bu nedenle mümkün olan örnek yanlışlıklarını azaltmak için ardışık örneklerin kısa zaman aralıklarında alınması gereklidir. Özellikle nütropenik hastaların taranmasında PCR kullanımı önerilmektedir (43).

2.8. Kandidoz Tedavisi

Mukokutanöz enfeksiyonlar nistatin ve amfoterisin B'nin topikal formülleriyle ya da mikonazol, ekonazol, klotrimazol, ketokonazol gibi azollerle tedavi edilebilir. Ancak, *Candida* onikomikozlarında, AIDS hastalarının mukokutanöz enfeksiyonlarında, tekrarlayan vajinitlerde ve ağır KMK olgularında sistemik/ ağızdan tedaviye gereksinim vardır; bunun için imidazoller, triazoller veya alilaminler kullanılabilir.

Antifungal ajanlar

Antifungal ajanlar deri, mukoza ve organların lokal veya sistemik enfeksiyonlarına karşı etkili bileşiklerdir. Topikal, oral ya da parenteral yoldan uygulanabilirler. Tedavinin başarılı olması için geniş spektrumlu, vücut doku ve sıvılarına iyi dağılım gösteren ve konakçıdan daha fazla fungal özgülüğü olan ajanlara gereksinim duyulmaktadır. Antifungal ilaçlar ile tedavide karşılaşılan en önemli sorunlar doz ve sürenin düzenlenmesi, gelişen direnç nedeni ile tedavinin değiştirilmesidir.

Antifungal ajanlar seçilirken bu ilaçların immün sistem ile olan ilişkisi de gözetilmelidir. Bazı antifungal ajanların immünmodülatör etkisi olduğu bilinmektedir ve sistemik kandidoz olgularında ilaçların immünmodülatör etkilerinden de yararlanılabilir.

Amfoterisin B (AmB)

AmB, *Streptomyces nodosus*'un bir suşundan elde edilen bir haptendir. Molekülündeki aminometilpentaz grubundan dolayı bazik bir maddedir. AmB, duyarlı fungus türlerinin hücre membranında bulunan bazı sterollere geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanır ve böylece membranda delikler oluşturur. Geçirgenliği bozulan membran hücrenin canlılığını devam ettiremez. Sonuçta fungisid etki gelişir. AmB'nin memeli membranında bulunan kolesterole az da olsa bağlanabilme özelliği vardır. Yan etkilerinin bir kısmından bunun sorumlu olduğu düşünülmektedir.

İntravenöz (IV) kullanılır.

C.albicans, *C.lusitaniae*, *C.guilliermondii*, *C.norvegensis* ve *C.parapsilosis*'in bazı suşları AmB'ye dirençli veya tolerandır.

Uygulamada hastaların % 20'sinde ateş, hipotansiyon ve taşikardiden oluşan akut, infüzyona bağlı reaksiyon gelişir. Bu reaksiyonun sitokin salıverilmesine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Amfotersin B'nin İmmünomodelatör Etkisi: Proinflamatuvar bir ilaçtır. AmB deoksikolat (AmB-D) doğuştan immün hücrelerin potent bir proinflamatuvar uyarandır. Klinik olarak AmB-D'nin proinflamatuvar aktivitesi akut infüzyonla ilişkili toksisitesini, miyalji, ateş, kızarıklık olarak görmek mümkündür, tüm bunlar inflamatuvar sitokinlerin yükselmiş kan seviyeleri ile ilişkilidir.

Mononükleer hücreler ve nötrofiller AmB-D'ye in vitro olarak maruz kaldıklarında hızla çok çeşitli inflamatuvar sitokin (TNF α , IL-6, IL-1RA ve IL-

1 β), kemokinler (IL-8, MCP-1 ve MIP-1 β), nitrik oksid, prostoglandinler, reaktif oksijen metabolitleri ve intersellüler adezyon molekülü 1'i salgılatırır. AmB'nin etkisi TLR2 ve CD14 üzerinden olur.

Ayrıca AmB'nin kazanılmış humoral bağışıklık üzerine de etkisi olduğuna dair kanıtlar vardır. İnvaziv kandidozdan iyileşen hastaların serumlarında ısı şok proteini 90'a (HSP 90) karşı oluşmuş yüksek seviyede antikorlar saptanmıştır. İn vitro ve hayvan çalışmalarında *Candida* türlerine karşı AmB ile anti-HSP 90 antikorların sinerjik çalıştığına dair kanıtlar mevcuttur.

Amfoterisin B ve Nistatinin Lipid Formülasyonları

Lipid formülasyonlarının uygulama alanına girmesi, AmB'nin terapötik indeksinin iyileştirilmesinde önemli bir adım olmuştur. Bu bileşikler, AmB'nin toksisitesinin azaltılması ve daha yüksek dozların verilmesine olanak yaratılması amacıyla geliştirilmiştir.

- Amfoterisin B Lipid Kompleksi
- Amfoterisin B Kolloidal Dispersiyon
- Lipozomal Amfoterisin B
- Lipid Emülsiyonunda Amfoterisin B

Amfotersin B'nin Lipid Formulasyonlarının İmmünodelatör Etkisi:

Değişik lipid formülasyonlarının monositlerin inflamatuvar sitokin üretimi üzerine farklı etkiler sergilemektedir. AmB koloidal dispersiyonu (ABCD), AmB-D gibi

inflatuar sitokinlerin salınımını arttırır. AmB lipid kompleks ve L-AmB inflamatuvar sitokinlerin salınımınıya azaltır ya da hiç etki göstermez (44).

Azol Grubu Antifungaller

Flukonazol

Antifungal etkili azoller esas olarak ergosterol sentezinde görev alan sitokrom p450 bağımlı lanosterol 14-demetilazı inhibe ederek etkilerini gösterir. Flukonazole *C.krusei* ve bazı *C.glabrata* türleri direnç geliştirebilir. Flukonazol diğer *Candida* ve *Cryptococcus* cinsi gibi diğer mayalar ile bazı küf mantarlarına etkilidir. Oral ve parenteral uygulama yapılabilir.

Flukonazolün tedavi ve profilakside yaygın şekilde kullanımı, direnç gelişebileceği endişelerini doğurmuştur. Uzun süreli düşük doz flukonazol tedavisi alan insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ile infekte bireylerde gelişen orofarengiyal kandidozda, flukonazole adım adım direnç geliştiği bilinen bir gerçektir.

İtrakonazol

İtrakonazol, oldukça geniş bir antifungal etki spektrumuna sahip bir azoldür. *Candida* türleri, *C.neoformans*, *Trichosporon* türleri, *Aspergillus* türleri, dematesöz küf mantarları ve termal dimorfik mantarlardan *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* ve *Sporothrix schenckii*'ye etkilidir.

Vorikonazol

Vorikonazol, flukonazolün yapısındaki bir triazolün yerini fluoroprimidin alması ve propanol temel iskeletine bir metil grubunun eklenmesiyle elde edilmiştir. Bu yapısal değişiklikler sonucunda hedef enzim lanosterol demetilazı inhibe edici aktivitesi artmış ve spektrumu genişlemiştir. Vorikonazol, *C.krusei* ve *C.glabrata* dahil olmak üzere *Candida* türlerine etkilidir. Hem oral hem de parenteral formülasyonu vardır.

Vorikonazol özefagus kandidozunda flukonazol kadar etkili bulunmuştur. İnvaziv kandidozda önce “kurtarma” tedavisi olarak denenmiş, % 56 yanıt elde edilmiştir. Flukonazole dirençli *C.krusei* enfeksiyonlarının tedavisinde başarılıdır.

Posakonazol

Posakonazol kimyasal olarak itrakonazole benzeyen 2. kuşak bir triazoldür. Flukonazole dirençli kökenler dahil bütün *Candida* türlerine etkilidir. Sadece oral formu vardır. Proflakside flukonazole alternatif olarak kullanılabilir.

Azolleri İmmunomodelatör etkisi: Funguslara karşı fagositlerle birlikte sinerjistik aktivite gösterirler. Azoller bağışık efektör hücreler ve sitokinlerle beraber fungal patojenlere karşı işbirliği yaparlar. Flukonazol ve vorikonazol, fagositik hücreler ile *C. albicans*’a karşı sinerjik etki gösterirler. Bu etki G-MCSF, G-CSF veya IFN- γ ile fagositler uyarılırsa daha da belirginleşir.

Azoller in vitro olarak monositlerin, makrofajların ve nötrofillerin *C.albicans*’a karşı olan fungisidal aktivitesini artırır.

Flukonazol, koruyucu Th1 yanıtını artırır, Vorikonazol de TLR2 ekspresyonunu ve monositlerin TNF- α üretimini artırır. IL-12 uygulaması da flukonazolün *C.albicans*'a karşı olan etkisini artırır (44).

Ekinokandinler

Ekinokandinler, diğer antifungallerden farklı bir etki mekanizmasına sahiptir. Diğer tüm antifungallerin hücre membranında etkili olmasına karşın, ekinokandinler hücre duvar yapısına giren beta-glukan sentezinde rol oynamaktadır. Ekinokandinler mantar hücre duvar yapısında bulunan β -(1,3)-D-glukan sentaz enzimini nonkompetitif olarak inhibe eder.

Bu grupta anidulafungin, kaspofungin ve mikafungin olmak üzere üç antifungal bulunmaktadır. Her üç bileşik de benzer etkinlik spektrumuna sahiptir. Standart dozlarda azollere ve AmB'ye direçli suşlar dahil *Candida* ve *Aspergillus* türlerine çok etkilidir.

Kaspofungin

Kaspofungin, 2001'de (ABD), 2003'te Türkiye'de lisans almıştır. Aminoasit yapısında hekzamer, suda eriyebilen, geniş spektrumlu yeni bir antifungaldir. Oral emilimi (<%2) düşüktür. 1-3 β -D glukan sentaz inhibisyonu ile hücre duvarında balonlaşma ve hücre lizisine sebep olur.

Yan etki az ve nadir olmakla birlikte etkiler mantar hücre duvarı için özgüldür. Histamin deşarjı; kızarıklık, ateş, bulantı, kusma, KCFT'de yükselmedir. Allerjik tipteki yan etkileri en sıktır. Ancak siklosporin ile

kullanımında dikkatli olunmalıdır. Kaspofungin triazol direnci olan türleri de kapsayacak şekilde çoğu *Candida* türlerine fungisidaldir. *Aspergillus* türlerine de fungistatik olduğu gösterilmiştir.

Mikafungin

Mart 2005’de FDA tarafından özofagiya kandidoz tedavisi ve HSCT uygulanan hastalarda *Candida* profilaksisinde onay almıştır. Preklinik çalışmalar azole dirençli *C. albicans* dahil tüm *Candida* türlerine ve *Aspergillus* türlerine etkili olduğunu göstermiştir.

Anidulafungin

Mikafunginin aksine yavaş olarak nonenzimatik parçalanmaya uğrar. Karaciğer bozukluğunda mikafunginde olduğu gibi doz ayarlanması gerekmez.

Ekinokandinlerin İmmünomodulator etkisi: Ekinokandinlerin de immünostimulatuvar özellikleri bulunmaktadır.

Kaspofungin β -glukan maskelenmesini bozup, fungusun bağışıklık sistemi hücrelerince fark edilmesini sağlayacak etkiyi gösterir (44).

2.9. İnvaziv Kandidozda Antifungal Profilaksi Yaklaşımı

Fungal infeksiyonların mortalite ve morbiditelerinin getirdiği sorunlar, hastaların uzun süre hastanede yatmalarının gerekmesi, antifungal ajanların çok

pahalı ve bazen toksik olmaları nedenleri ile enfeksiyonların başlamadan önlenmesi demek olan profilaksiye sıklıkla başvurulmaktadır (10).

Proflaktik yaklaşımlar yüzeysel ve sistemik fungal enfeksiyonları ve bunlara bağlı mortaliteyi azaltmak amacıyla risk altında olan hastalara uygulanabilir. Profilakside ateş gibi bir enfeksiyon belirtisi bulunmamaktadır. Empirik tedaviye başlamak için ise hastalığın varlığı değil, onun yerini tutabilecek bir işaretleyici olan ateş kullanılır (45).

Antifungal profilaksi, özellikle AIDS hastalığının ortaya çıkması ve buna bağlı *Candida* enfeksiyonlarının artması ile önem kazanmıştır. 1980'li yıllarda azollerin sunulması ile birlikte bu konuda başarılı sonuçlar alınmıştır (46).

Kök hücre nakli uygulamalarında flukonazol profilaksisi rutine girmiş olup, özellikle allojenik nakillerde halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Kök hücre nakli dışındaki hematolojik maligniteli hastalarda profilaksi önerilmemektedir. *Candida*'ya yönelik bu yaklaşım kök hücre hastalarında yüz güldürücü iken, flukonazole dirençli *Candida* ve non-*albicans Candida* enfeksiyonlarında artış olması olumsuz etkilerindendir (47).

Özellikle tekrarlanan kemoterapi (KT) alan hastalarda sekonder profilaksi gündeme gelmektedir. Bu yaklaşım daha önce KT almış, ancak invaziv fungal enfeksiyon tanısı almış hastalarda, yeniden KT verileceği zaman gündeme gelmektedir. Vorikonazol ve amfoterisin B'nin sekonder profilakside etkisi olduğu bazı çalışmalarla gösterilmiştir (48).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamıza 2010- 2011 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji bilim dalında takip edilmekte olan hastalar dahil edildi. Hasta grubunu; kandidemisi PZR ile doğrulanmış olan bağışık sistemi baskılı 20 hasta oluşturdu. Hasta kontrol grubuna bağışık sistemi baskılanmış kandidemi olmadığı PZR ile doğrulanmış 10 hasta ve sağlıklı kontrol grubuna da Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Moleküler Laboratuvarına başvuran 10 sağlıklı kişi dahil edildi. Hastalardan ve sağlıklı gönüllülerden alınan serum örneklerinde çeşitli sitokinlerin düzeyleri ELISA testi ile belirlendi.

Çalışmamızla ilgili etik kurul kararı Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 27.04.2011 tarih ve 113 numaralı kararı ile alınmıştır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Laboratuvar araçları

Mikropipetler ve uçları (Beta Pette™, ABD)

Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

Derin dondurucu (Uğur, Türkiye)

Sınıf 2 biyogüvenlik kabini (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

ELISA okuma cihazı (Das Plate Reader, Almanya)

Santrifüj cihazı (HERLE Z380, Almanya)

Mikrosantrifüj (Heaeus, Almanya)

Vorteks (Heidolph, Almanya)

Cam eşyalar, özeler, kuru blok (Bio TDB-100, Almanya)

Heliosis Ekstraksiyon Modülü (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

Light Cycler® 2.0 (Roche, Almanya)

3.1.2. Sarf Malzemeler

ELISA kitleri (Bender Medsystems, Austria)

ELISA kitleri (Bioscience, Austria)

Enjektör (Superset, Türkiye)

Steril distile su

3.2. Yöntemler

3.2.1. Alınan örneklerle yapılan işlemler

Etilen Diamin Tetra Asetik Asitli (EDTA) tüplere alınan kan örnekleri *Candida* DNA' sının aranması için PZR işlemi yapılmak üzere ayrılmıştır. Heparinli tüplere alınan kan örneklerinin serumu sitokin varlığının araştırılması için saklanmıştır. Bütün örnekler uygun ambalajlar içinde, işlem gününe kadar -20°C' de saklanmıştır.

3.2.2. DNA'nın eldesi

Alınan serum örneklerinden mantarlara ait DNA, Heliosis Ekstraksiyon Modülü (Metis Biyoteknoloji, Türkiye) kullanılarak elde edilmiştir.

EDTA'lı tüplerdeki kan örnekleri saflaştırmaya alınmadan önce eritrositlerin uzaklaştırılması için kırmızı kan hücresi (Red Blood Cell) lizis solüsyon protokol uygulanmıştır.

1. Örneklerden 300 µl alınıp 1.5 ml'lik ependorf tüplerine aktarılmıştır.
2. Üzerlerine 1.2 ml kırmızı kan hücresi lizis solüsyonundan eklenmiş ve pipetaj ile iyice karıştırılmıştır. Sonra 5 dakika -20°C'de bekletilmiştir.
3. Üç dakika oda sıcaklığında 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
4. Üst kısım çökeleğe dokunmadan pipetle alınmıştır.
5. Çökelek rengi kırmızı ve daha koyu ise 2. ve 3. basamaklar tekrar edilmiştir.

3.2.3. Saflaştırma Basamakları

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 üzerine 500 µl DNA çöktürme solüsyonu eklenmiş ve vortekslenmiştir.
4. Onbeş dakika 13000 rpm' de santrifüj edilmiştir.
5. Üst kısım çökeleğe dokunmadan pipetle tamamen alındıktan sonra 500

- µl DNA yıkama solüsyonu eklenmiş ve vortekslenmiştir.
6. Beş dakika 13000 rpm’ de santrifüj edilmiştir.
 7. Üst kısım pipetle tamamen alınmış ve tüpler 10 dakika oda sıcaklığında kurutulmuştur.
 8. 20 µl DNA dilüsyon solüsyonundan konulmuş, vortekslenip spin santrifüj edilmiştir.
 9. Tüm DNA örnekleri çoğaltma işlemine kadar -20⁰C de bekletilmiştir.

3.2.4. DNA’ nın çoğaltılması ve gösterilmesi

Elde edilen DNA’lar hedeflenen primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. *Candida* DNA’ sının gösterilmesi için *Candida*’ ya özgül primer-probe karışımı ile gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılmıştır.

Tablo 1. PZR için kullanılan primer ve prob dizileri

Primer	5’-3’ yönünde dizi
<i>Candida</i> primer forward	CCT-GTT-TGA-GCG-TCR-TTT
<i>Candida</i> primer reverse	TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT
<i>Candida</i> probe	6FAM – CAT-TGC-TTG-CGG-CGG-TA – TMR

Tablo 2. Mantar primerleri kullanarak hazırlanan PZR karışımı

KARIŞIM	1X	15X
Su	2 µL	30 µL
MgCl ₂ (25mM)	1 µL	15 µL
Fw primer (25 pmol)	1 µL	15 µL
Rev primer (25 pmol)	1 µL	15 µL
TaqMan Probe (20 pmol)	0.5 µL	7.5 µL
Hidroliz Probu	2 µL	30 µL
Toplam Hacim	7.5 µL	112.5 µL

Her örnek için hazırlanan ana karışımdan 7.5 µl, DNA'dan ise 2.5 µl kapillerlere eklenmiştir. Amplifikasyon kontrolü için sadece karışımdan 10 µL bir kapiller içerisine konularak (içinde DNA yoktur) buna negatif kontrol denmiş ve sadece bu kapillerin kapağı karışım odasında (temiz oda) kapatılmıştır. Diğerleri ise kurşun bloğun içinde ekstraksiyon odasında bulunan biyogüvenlik kabini (Metis biyoteknoloji, Türkiye) içine götürülmüş ve orada DNA örneği eklenmiştir. Örnekler hızlı bir şekilde spin santrifüj edilerek LightCycler ® 2.0 (Roche, Almanya) cihazına yerleştirilmiştir.

Amplifikasyon TaqMan teknolojisi ile gerçekleştirilmiştir; Isı döngüsü aşağıda verilmiştir. Gerçek zamanlı PZR amplifikasyonu sonrasında, “absolute quantification” analizi incelenmiştir.

Tablo 3. Çoğaltma protokolü safhaları

Denaturasyon

Siklus	1
Analiz Modu	Yok
<i>Isı değişimleri</i>	<i>1. segment</i>
Hedef ısı (°C)	95° C
İnkubasyon zamanı	10 dakika
Isı değişim oranı (°C/saniye)	20.0
İkinci hedef ısı(°C)	0
Basamak uzunluğu (°C)	0.0
Step gecikmesi	0
Okuma modu	Yok

Amplifikasyon

Siklus	50	
Analiz Modu	Kantitasyon	
<i>Isı Değişimleri</i>	<i>Segment 1</i>	<i>Segment 2</i>
Hedef ısı (°C)	95	60
İnkubasyon zamanı (h:min:s)	10	40
Isı değişim oranı (°C/s)	20.0	20.0
İkinci hedef ısı (°C)	0	0
Basamak uzunluğu (°C)	0.0	0.0
Basamak gecikmesi (Siklus)	0	0
Okuma modu	Yok	Tek

Soğutma

Siklus	1
Analiz Modu	Yok
<i>Isı Değişimleri</i>	<i>Segment 1</i>
Hedef ısı (°C)	40
İnkubasyon zamanı	30
Isı değişim oranı (°C/saniye)	20.0
İkinci hedef ısı (°C)	0
Basamak uzunluğu (°C)	0.0
Basamak gecikmesi (Siklus)	0
Okuma modu	Yok

3.2.5. ELISA ile Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi

Hasta ve sağlıklı gönüllülerin serumlarında IL-2 IL-10, TGF β 1, IL-6, TNF α , IFN γ , seviyelerini ölçmek için Human Instant ELISA (Bender MedSystems, Austria) IL-17 seviyelerini ölçmek için Platinum ELISA (Bioscience, Austria) kitleri kullanılmıştır.

ELISA Yöntemi ile IL-2 IL-10, TGF β 1, IL-6, TNF α , IFN γ Düzeylerinin Ölçülmesi.

IL-2 Tayini: İnsan IL-2 ELISA kitinde (Bender MedSystems) sandwich ELISA yöntemi kullanılmıştır. İnsan IL-2'e özgül antikor ile kaplı 96 kuyucuklu plaklar kullanılmıştır.

Standart ve Örneklerin Hazırlanması: Testte kullanılacak olan standartlar kit ile birlikte kuyucuklara kaplanmış olarak bulunmaktadır.

Tablo 4. IL-2 ELISA standart konsantrasyonları

	1	2	3	4	5	6	7
A	Standart1(1200pg/ml)	Örnek 1	Örnek 8	Örnek 15	Örnek 22	Örnek 29	Örnek 36
B	Standart2 (600pg/ml)	Örnek 2	Örnek 9	Örnek 16	Örnek 23	Örnek 30	Örnek 37
C	Standart3 (300 pg/ml)	Örnek 3	Örnek 10	Örnek 17	Örnek 24	Örnek 31	Örnek 38
D	Standart4 (150 pg/ml)	Örnek 4	Örnek 11	Örnek 18	Örnek 25	Örnek 32	Örnek 39
E	Standart5 (75 pg/ml)	Örnek 5	Örnek 12	Örnek 19	Örnek 26	Örnek 33	Örnek 40
F	Standart6 (38 pg/ml)	Örnek 6	Örnek 13	Örnek 20 22	Örnek 27	Örnek 34	BOŞ
G	Standart 7(19 pg/ml)	Örnek 7	Örnek 14	Örnek 21	Örnek 28	Örnek 35	BOŞ

IL-6 Tayini: İnsan IL-6 kitinde (Bender MedSystems) sandwich ELISA metodu kullanılmıştır. İnsan IL-6'ya özgül antikor ile kaplı 96 kuyucuklu plaklar kullanılmıştır.

Standart ve Örneklerin Hazırlanması: Testte kullanılacak olan standartlar kit ile birlikte kuyucuklara kaplanmış olarak bulunmaktadır.

Tablo 5. IL-6 ELISA standart konsantrasyonları

	1	2	3	4	5	6	
A	Standart 1 (200pg/ml)	Örnek 1	Örnek 8	Örnek 17	Örnek 25	Örnek 33	Örnek 40
B	Standart 2 (100pg/ml)	Örnek 2	Örnek 9	Örnek 18	Örnek 26	Örnek 34	BOŞ
C	Standart 3 (50 pg/ml)	Örnek 3	Örnek 10	Örnek 19	Örnek 27	Örnek 35	BOŞ
D	Standart 4 (25 pg/ml)	Örnek 4	Örnek 11	Örnek 20	Örnek 28	Örnek 36	BOŞ
E	Standart 5 (12.5 pg/ml)	Örnek 5	Örnek 12	Örnek 21	Örnek 29	Örnek 37	BOŞ
F	Standart 6 (6.3 pg/ml)	Örnek 6	Örnek 13	Örnek 15	Örnek 30	Örnek 38	BOŞ
G	Standart 7 (3.1 pg/ml)	Örnek 7	Örnek 14	Örnek 16	Örnek 31	Örnek 39	BOŞ

IL-10 Tayini: İnsan IL10 kitinde (Bender MedSystems) sandwich ELISA metodu kullanılmıştır. İnsan IL-10'a özgül antikor ile kaplı 96 kuyucuklu plaklar kullanılmıştır.

Standart ve Örneklerin Hazırlanması: Testte kullanılacak olan standartlar kit ile birlikte kuyucuklara kaplanmış olarak bulunmaktadır.

Tablo 6. IL-10 ELISA standart konsantrasyonları

	1	2	3	4	5	6
A	Standart1 (200.0pg/ml)	Örnek 1	Örnek 9	Örnek 17	Örnek 25	Örnek 33
B	Standart2 (100.0pg/ml)	Örnek 2	Örnek 10	Örnek 18	Örnek 26	Örnek 34
C	Standart3 (50.0 pg/ml)	Örnek 3	Örnek 11	Örnek 19	Örnek 27	Örnek 35
D	Standart4 (25.0 pg/ml)	Örnek 4	Örnek 12	Örnek 20	Örnek 28	Örnek 36
E	Standart5 (12.5 pg/ml)	Örnek 5	Örnek 13	Örnek 21	Örnek 29	Örnek 37
F	Standart6 (6.3 pg/ml)	Örnek 6	Örnek 14	Örnek 22	Örnek 30	Örnek 38
G	Standart7 (3.1 pg/ml)	Örnek 7	Örnek 15	Örnek 23	Örnek 31	Örnek 39
H	BOŞ	Örnek 8	Örnek 16	Örnek 24	Örnek 32	Örnek 40

TNF- α Tayini: İnsan TNF- α kitinde (Bender MedSystems) sandwich ELISA metodu kullanılmıştır. İnsan TNF- α 'ye özgül antikor ile kaplı 96 kuyucuklu plaklar kullanılmıştır.

Standart ve Örneklerin Hazırlanması: Testte kullanılacak olan standartlar kit ile birlikte kuyucuklara kaplanmış olarak bulunmaktadır.

Tablo 7. TNF- α ELISA standart konsantrasyonları

	1	2	3	4	5	6
A	Standart1 (500.0pg/ml)	Örnek 1	Örnek 9	Örnek 17	Örnek 25	Örnek 33
B	Standart2 (250.0pg/ml)	Örnek 2	Örnek 10	Örnek 18	Örnek 26	Örnek 34
C	Standart3 (125.0 pg/ml)	Örnek 3	Örnek 11	Örnek 19	Örnek 27	Örnek 35
D	Standart4 (62.5 pg/ml)	Örnek 4	Örnek 12	Örnek 20	Örnek 28	Örnek 36
E	Standart5 (31.3 pg/ml)	Örnek 5	Örnek 13	Örnek 21	Örnek 29	Örnek 37
F	Standart6 (15.6 pg/ml)	Örnek 6	Örnek 14	Örnek 22	Örnek 30	Örnek 38
G	Standart7 (7.8 pg/ml)	Örnek 7	Örnek 15	Örnek 23	Örnek 31	Örnek 39
H	BOŞ	Örnek 8	Örnek 16	Örnek 24	Örnek 32	Örnek 40

IFN- γ Tayini: İnsan IFN- γ kitinde (Bender MedSystems) sandwich ELISA metodu kullanılmıştır. İnsan IFN- γ 'e özgül antikor ile kaplı 96 kuyucuklu plaklar kullanılmıştır.

Standart ve Örneklerin Hazırlanması: Testte kullanılacak olan standartlar kit ile birlikte kuyucuklara kaplanmış olarak bulunmaktadır. Konsantrasyonları Tablo 8'de belirtilmiştir.

Tablo 8. IFN- γ ELISA standart konsantrasyonları

	1	2	3	4	5	6
A	Standart1 (100.0pg/ml)	Örnek 1	Örnek 9	Örnek 17	Örnek 25	Örnek 33
B	Standart2 (50.0pg/ml)	Örnek 2	Örnek 10	Örnek 18	Örnek 26	Örnek 34
C	Standart3 (25.0 pg/ml)	Örnek 3	Örnek 11	Örnek 19	Örnek 27	Örnek 35
D	Standart4 (12.5 pg/ml)	Örnek 4	Örnek 12	Örnek 20	Örnek 28	Örnek 36
E	Standart5 (6.3 pg/ml)	Örnek 5	Örnek 13	Örnek 21	Örnek 29	Örnek 37
F	Standart6 (3.1 pg/ml)	Örnek 6	Örnek 14	Örnek 22	Örnek 30	Örnek 38
G	Standart7 (1.6 pg/ml)	Örnek 7	Örnek 15	Örnek 23	Örnek 31	Örnek 39
H	BOŞ	Örnek 8	Örnek 16	Örnek 24	Örnek 32	Örnek 40

-20°C’ de saklanan plazma örnekleri oda ısısında çözünmüştür

Konjugat dışında tüm ELISA kitinde bulunan standart dilusyon tamponu, standart, 96 kuyucuklu ELISA plağı ve plazma örnekleri, çalışmaya başlamadan en az 1 saat önce dolaptan çıkartılarak oda sıcaklığına gelmeleri için beklenmiştir.

Standart ve Örneklerin ELISA Kuyucuklarına Konulması:

IL-2 IL-10, IL-6, TNF α , IFN γ düzeylerinin ölçülmesi için kitte belirtilen uygulama sırasıyla aşağıdaki gibidir:

- 1- Standart ve örnek kuyucuklarına 100 μ l distile su konulmuştur.
- 2- Plazma örneklerinden 50 μ l kuyucuklara pipetlenmiştir.
- 3- Pipetlenmiş plağın yüzeyi şeffaf örtü ile kapatıldıktan sonra 3 saat boyunca oda ısısında horizontal karıştırıcı sisteminde inkübasyona bırakılmıştır.
- 4- Plağın yüzeyindeki şeffaf örtü kaldırılır. Kuyucuklar 400 μ l yıkama solüsyonu ile 6 kez yıkanmıştır.
- 5- Bütün kuyucuklara 100 μ l TMB substrat solüsyonu pipetlenmiştir.
- 6- Plak, karanlık ortamda oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir.
- 7- 100 μ l stop solüsyonu pipetlenip reaksiyon durdurulmuştur.

ELISA Yöntemi ile TGF β 1 Düzeylerinin Ölçülmesi

TGF- β Tayini: İnsan TGF- β kitinde (Bender MedSystems) sandwich ELISA metodu kullanılmıştır. İnsan TGF- β 'ye özgül antikor ile kaplı 96 kuyucuklu plaklar kullanılmıştır.

TGF- β İçin Standart ve Örneklerin Hazırlanması: Testte kullanılacak olan standartlar kit ile birlikte kuyucuklara kaplanmış olarak bulunmaktadır.

Tablo 9. TGF- β ELISA standart konsantrasyonları

	1	2	3	4	5	6
A	Standart1(4000pg/ml)	Örnek 1	Örnek 9	Örnek 17	Örnek 25	Örnek 33
B	Standart2 (2000 pg/ml)	Örnek 2	Örnek 10	Örnek 18	Örnek 26	Örnek 34
C	Standart3 (1000 pg/ml)	Örnek 3	Örnek 11	Örnek 19	Örnek 27	Örnek 35
D	Standart4 (500 pg/ml)	Örnek 4	Örnek 12	Örnek 20	Örnek 28	Örnek 36
E	Standart5 (250 pg/ml)	Örnek 5	Örnek 13	Örnek 21	Örnek 29	Örnek 37
F	Standart6 (125 pg/ml)	Örnek 6	Örnek 14	Örnek 22	Örnek 30	Örnek 38
G	Standart7 (63 pg/ml)	Örnek 7	Örnek 15	Örnek23	Örnek 31	Örnek 39
H	BOŞ	Örnek 8	Örnek16	Örnek 24	Örnek 32	Örnek 40

-20°C’ de saklanan plazma örnekleri oda ısısında çözünmüştür. Çözündükten sonra her bir plazma örneği 1:10 oranında standart diluent tamponuyla dilue edildi (180µl dilüent+20µl örnek). 20µl 1N HCL 200µl dilüe edilmiş olan örnekle karıştırılıp oda ısısında 1 saat inkübe edilmiştir. 20µl 1N NaOH eklenerek nötralize edilmiş ve ELISA çalışma aşamalarına hazır hale getirilmiştir.

Konjugat dışında tüm ELISA kitinde bulunan standart dilusyon tamponu, standart, 96 kuyucuklu ELISA plağı ve plazma örnekleri, çalışmaya başlamadan en az 1 saat önce dolaptan çıkartılarak oda sıcaklığına gelmeleri için beklenmiştir.

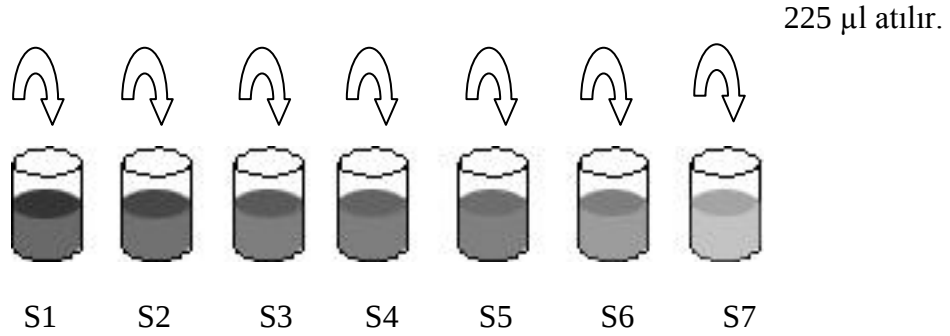
TGF- β İçin Standart ve Örneklerin ELISA Kuyucuklarına Konulması:

- 1- Standart ve örnek kuyucuklarına 110 μ l distile su konulmuştur.
- 2- Plazma örneklerinden 40 μ l kuyucuklara pipetlenmiştir.
- 3- Pipetlenmiş plağın yüzeyi şeffaf örtü ile kapatıldıktan sonra 3 saat boyunca oda ısısında horizontal karıştırıcı sisteminde inkübasyona bırakılmıştır.
- 4- Plağın yüzeyindeki şeffaf örtü kaldırılır. Kuyucuklar 400 μ l yıkama solüsyonu ile 6 kez yıkanmıştır.
- 5- Bütün kuyucuklara 100 μ l TMB substrat solüsyonu pipetlenmiştir.
- 6- Plak, karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir.
- 7- 100 μ l stop solüsyonu pipetlenip reaksiyon durdurulmuştur.

ELISA Yöntemi ile IL-17 Düzeylerinin Ölçülmesi

IL-17 Tayini: İnsan IL-17 kitinde (eBioscience, Avusturya) sandwich ELISA metodu kullanılmıştır. İnsan IL-17'e özgül antikor ile kaplanmış 96 kuyucuklu plaklar kullanılmıştır.

IL-17 İçin Standart ve Örneklerin Hazırlanması: Standartların seri dilusyonları mikrosantrifüj tüplerinde hazırlanmıştır. 7 adet mikrosantrifüj tüpü içerisine 225' er µl sample dilüent pipetlenmiştir. 1. tüpe 225 µl standart konulup, iyice karıştırılmıştır. 1. Tüpten 225 µl alınıp, 2. Tüpe konulmuş, 2.tüpten 225 µl alınıp 3. Tüpe aktarılmış ve son tüpe kadar seri dilusyonlar yapılmıştır. 7:tüpe de 225 µl konulup karıştırılmış ve içinden 225 µl alınıp atılmıştır.



Şekil 2. Standart seri dilusyonların hazırlanması

(225 µl sample diluent tüplere eklenmiştir. 225µl transfer edilir.)

-20⁰C' de saklanan plazma örnekleri oda ısısında çözünmüştür

Konjugat dışında tüm ELISA kitinde bulunan standart dilusyon tamponu, standart, 96 kuyucuklu ELISA plağı ve plazma örnekleri, çalışmaya başlamadan en az 1 saat önce dolaptan çıkartılarak oda sıcaklığına gelmeleri için beklenmiştir.

Tablo 10. IL-17 ELISA standart konsantrasyonları

	1	2	3	4	5	6
A	Standart1 (100.0pg/ml)	Örnek 1	Örnek 9	Örnek 17	Örnek 25	Örnek 33
B	Standart2 (50.0 pg/ml)	Örnek 2	Örnek 10	Örnek 18	Örnek 26	Örnek 34
C	Standart3 (25.0 pg/ml)	Örnek 3	Örnek 11	Örnek 19	Örnek 27	Örnek 35
D	Standart4 (12.5 pg/ml)	Örnek 4	Örnek 12	Örnek 20	Örnek 28	Örnek 36
E	Standart5 (6.3 pg/ml)	Örnek 5	Örnek 13	Örnek 21	Örnek 29	Örnek 37
F	Standart6 (3.1 pg/ml)	Örnek 6	Örnek 14	Örnek 22	Örnek 30	Örnek 38
G	Standart7 (1.6 pg/ml)	Örnek 7	Örnek 15	Örnek 23	Örnek 31	Örnek 39
H	BOŞ	Örnek 8	Örnek 16	Örnek 24	Örnek 32	Örnek 40

IL-17 İçin Standart ve Örneklerin ELISA Kuyucuklarına Konulması

- 1- Hazırlanmış olan standartlardan kuyucuklara 100µl pipetlenmiştir
- 2- Hasta serumlarından kuyucuklara 100 µl konulmuştur.
- 3- Kuyucuklara 50 µl sample diluent eklenmiştir.
- 4- Kuyucuklara 50 µl biotin konjugat pipetlenmiştir.

- 5- Pipetlenmiş plağın yüzeyi şeffaf örtü ile kapatıldıktan sonra 2 saat boyunca oda ısısında horizontal karıştırıcı sisteminde inkübasyona bırakılmıştır
- 6- Plağın yüzeyindeki şeffaf örtü kaldırılıp, kuyucuklar 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.
- 7- Kuyucuklara 100 µl Streptavidin-HRP eklenmiştir.
- 8- Pipetlenmiş plağın yüzeyi şeffaf örtü ile kapatıldıktan sonra 1 saat boyunca oda ısısında horizontal karıştırıcı sisteminde inkübasyona bırakılmıştır
- 9- Plağın yüzeyindeki şeffaf örtü kaldırılıp, kuyucuklar 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır
- 10- 100µl TMB substrat solusyonu konulmuştur.
- 11- Plak 10 dakika boyunca oda ısısında inkübe edilmiştir.
- 12- Kuyucuklara 100 µl durdurma solusyonu eklenmiştir.

Plakların Okunması

Bütün ELISA plaklarındaki optik yoğunluk (OD) 450 nm’de spektrofotometrede 450nm dalga boyu ve 630 nm referans filtrede ELISA okuyucusunda (Das Plate Reader, Almanya)) değerlendirilmiştir.

3.3. Araştırılan Diğer Parametrelerin Tespiti

Hastaların tanıları, antifungal ilaç, antiviral ilaç, antibiyotik ve immünsupresan ilaç kullanımları, nötropeni varlığı ile ilgili bilgiler hastaların dosyalarının taranmasıyla elde edilmiştir.

3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 15.0 (spss Inc., USA) bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Kolmogirov-Simirnov testine göre verilerin normal dağılıma uymadığı saptanmış, bu yüzden non-parametrik testler kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Deney grupları

- 1- Grup I (Deney grubu): *Candida* PZR pozitif, nütropenik hasta grubu (20 hasta)
- 2- Grup II (Kontrol grubu): *Candida* PZR negatif, nütropenik hasta grubu (10 hasta)
- 3- Grup III: Sağlıklı kontrol grubu (10 gönüllü kişi)

4.1. Hastaların Bazı Tanımlayıcı Özellikleri

Deney grubundaki hastaların yaş ortalaması $38 \pm$ olup, 14 erkek, 6 kadından oluşmaktadır. Kontrol grubundaki hastaların yaş ortalaması $35 \pm$ olup, 9'u erkek, 1'i kadındır. Sağlıklı kontrol grubundaki kişilerin yaş ortalaması $32 \pm$ olup, 8'i erkek, 2'si kadındır. Grupların yaş ortalamaları Mann Whitney-U testi ($p= 0.45$) ile grupların cinsiyet dağılımı Fisher'in Kesin Ki-kare Testi ($p=0.67$) ile karşılaştırılmıştır.

Tablo 11. Grupların Yaş Ortalamaları ve Ortancaları

	Ortalama $\pm$ SD	Ortanca (min-max)	*p=0.45
Grup 1	38 ± 12	35 (22-72)	
Grup 2	35 ± 12	30 (24-62)	
Grup 3	32 ± 11	29 (23-61)	

Tablo 12. Grupların Cinsiyet Dağılımı

Cinsiyet	Erkek		Kadın		$\chi^2=*$ p=0.67
	n	%	n	%	
Grup 1	14	70.0	6	30.0	
Grup 2	9	90.0	1	10.0	
Grup 3	8	80.0	2	20.0	

Deney grubundaki ve kontrol grubundaki hastaların sitokin düzeylerini etkilemesi olası olan hastalara ait bazı özellikler dosyaları taranarak belirlenmiştir. Deney ve kontrol grubu nötropenisi olan hastalardan oluşturulmuş olup, beyaz küre sayısı <1500/ml veya nötrofil sayısı <500/ml nötropeni olarak kabul edilmiştir. Hastaların tanıları, immünsupresan ilaç, antifungal ilaç, antiviral ilaç ve antibiyotik kullanımları *Candida* PZR çalışılma tarihlerine uygun olarak araştırılmıştır. Grupların bazı tanımlayıcı özellikleri Tablo 13’de gösterilmektedir.

Tablo 13. Grupların Bazı Tanımlayıcı Özellikleri

	Grup 1		Grup 2		p
	n	%	n	%	
Antifungal					
Kullanıyor	9	45.0	5	50.0	1.0
Kullanmıyor	11	55.0	5	50.0	
Antiviral					
Kullanıyor	10	50.0	6	60.0	0.71
Kullanmıyor	10	50.0	4	40.0	
Antibiyotik					
Kullanıyor	10	50.0	8	80.0	0.23
Kullanmıyor	10	50.0	2	20.0	
Tanı					
Lösemi	12	60.0	5	50.0	0.12
Lenfoma	6	30.0	1	10.0	
Diğer	2	10.0	4	40.0	

Deney grubu, kontrol grubu, sağlıklı kontrol grubunun sitokin düzeylerinin ortalama değerleri alınmıştır. Bu üç grubun sitokin düzeyleri karşılaştırıldığında IL-10, TNF- α , TGF- β ve IL-6 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 14,15,16, 17). Üç grup arasında sitokin değerleri bakımından saptanan fark deney grubundan kaynaklanmaktadır. Deney grubunun değerleri daha yüksektir. Çalışmada düzeyleri belirlenen diğer sitokinler olan, IL-2, IL-17 ve IFN- γ için deney grubu, kontrol grubu ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Kruskall-Wallis testi, $p>0.005$) (Tablo 18,19,20).

Tablo 14. Gruplar arasında IL-10 serum düzeylerinin karşılaştırılması

IL-10	Ortalama $\pm$ SD	Ortanca (min-max)	*p=0.001
Grup 1	18.39 $\pm$ 12.94	17.76 (3.24-56.09)	
Grup 2	0.53 $\pm$ 0.24	0.49 (0.14-0.95)	
Grup 3	7.51 $\pm$ 12.9	1.56 (0.23-39.85)	

Tablo 15. Gruplar arasında TNF- α serum düzeylerinin karşılaştırılması

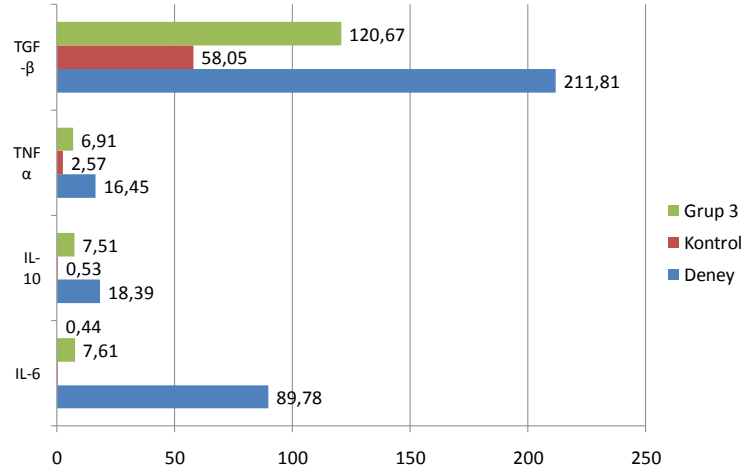
TNF- α	Ortalama $\pm$ SD	Ortanca (min-max)	*p=0.001
Grup 1	16.45 $\pm$ 6.91	18.39 (4.92-33.94)	
Grup 2	2.57 $\pm$ 3.85	2.91 (-6.93-6.36)	
Grup 3	6.91 $\pm$ 6.28	5.70 (0.04-18.53)	

Tablo 16. Gruplar arasında TGF- β serum düzeylerinin karşılaştırılması

TGF- β	Ortalama $\pm$ SD	Ortanca (min-max)	*p=0.001
Grup 1	211.81 $\pm$ 131.74	130.97 (75.65-433.87)	
Grup 2	58.05 $\pm$ 11.87	57.52 (44.13-80.02)	
Grup 3	120.67 $\pm$ 128.58	65.07 (50.64-471.38)	

Tablo17. Gruplar arasında IL-6 serum düzeylerinin karşılaştırılması

IL-6	Ortalama±SD	Ortanca (min-max)	*p=0.002
Grup 1	89.78±155.48	49.81 (8.44-715.53)	
Grup 2	0.44±0.24	0.47(0.03-0.80)	
Grup 3	7.61±5.35	5.30 (1.62-18.66)	



Grafik 1. TGFβ, TNF-α, IL-10, IL-6 sitokin düzeylerinin gruplara göre dağılımı

Tablo 18. Gruplar arasında IL-2, serum düzeylerinin karşılaştırılması

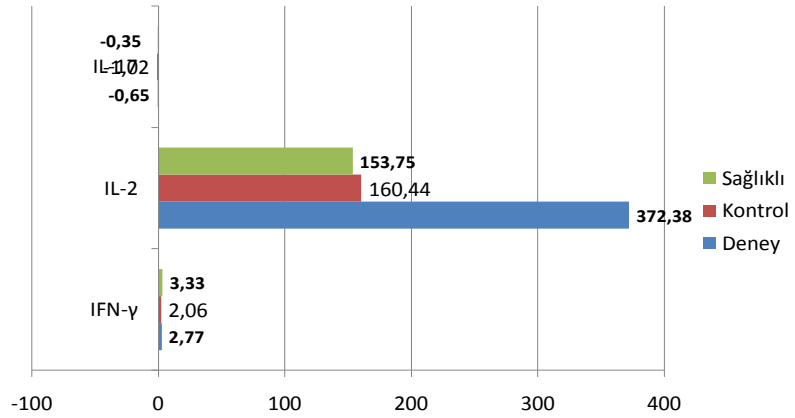
IL-2	Ortalama±SD	Ortanca (min-max)	*p=0.013
Grup 1	372.38±215.05	350.15 (96.03-686.60)	
Grup 2	160.44±54.78	179.77 (42.66-215.92)	
Grup 3	153.75±66.72	144.90 (44.99-261.70)	

Tablo 19. Gruplar arasında IL-17 serum düzeylerinin karşılaştırılması

IL-17	Ortalama±SD	Ortanca (min-max)	*p=0.016
Grup 1	-0.65±0.39	-0.73 (-1.22/-0.04)	
Grup 2	-1.02±0.08	-1.03 (-1.16/-0.88)	
Grup 3	-0.35±2.25	-1.05 (-1.18/6.06)	

Tablo 20. Gruplar arasında IFN- γ serum düzeylerinin karşılaştırılması

IFN- γ	Ortalama±SD	Ortanca (min-max)	*p=0.30
Grup 1	2.77±2.49	1.87 (0.69-10.10)	
Grup 2	2.06±2.06	1.26 (0.07-5.37)	
Grup 3	3.33±2.05	3.59 (0.44-6.48)	



Grafik 2. IL-2, IFN- γ , IL-17 düzeylerinin gruplara göre dağılımı

Deney grubundaki ve kontrol grubundaki hastaların aldıkları tanılar lösemi, lenfoma ve diğerleri olarak gruplandırılmıştır. Diğer tanılar multiple miyelom, aplastik anemi, miyelodisplastik sendrom, paroksizmal nokturnal hemoglobinüriyi içermektedir. Hastaların almış oldukları tanılar ile ölçülen sitokin değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.005$).

Deney grubundaki 20 hastadan 9'u, kontrol grubundaki 10 hastadan 5'i *Candida* PCR çalışıldığı tarihte antifungal tedavi almışlardır. Antifungal olarak flukonazol, vorikonazol, itrakonazol ve posakonazol preparatları kullanılmıştır. Her iki grup, antifungal kullanımları ile sitokin ifadenmesi yönünden analiz edildiğinde antifungal kullanımı ve sitokin düzeyleri arasında ilişki saptanmamıştır ($p>0.005$).

Deney grubundaki 20 hastadan 10'u, kontrol grubundaki 10 hastadan 6'sı *Candida* PZR çalışıldığı tarihte antiviral tedavi almışlardır. Antiviral olarak asiklovir ve lamivudin kullanılmıştır. Gruplar arasında antiviral kullanımı ve sitokin salınımı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.005$).

Deney grubundaki 20 hastadan 10'u, kontrol grubundaki 10 hastadan 8'i de *Candida* PZR çalışıldığı tarihte antibiyotik tedavisi almaktaydı. Antibiyotik olarak etken maddeleri linezolid, trimetoprim-sülfometaksazol, levofloksasin, izonikotinic asid hidrazid, imipenem olan preparatlar kullanılmıştır. Her iki grup antibiyotik kullanımı ile sitokin düzeyleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olmadığı görülmüştür ($p>0.005$).

5. TARTIŞMA

Mantar enfeksiyonlarının tanısı ve patogenezi son yılların önemli araştırma konularından biridir. Patogenezin tam olarak anlaşılması sayesinde elimizde mevcut olan kısıtlı sayıdaki antifungal ilacın çok daha etkin bir şekilde kullanılması beklenmektedir. Ayrıca enfeksiyon sırasında konak tarafından geliştirilen bağışık cevabın incelenmesi yeni tedavi seçeneklerinin bulunmasına da yardım edecektir. Konak tarafından salgılanan sitokinler bağışık yanıtın düzenlenmesinde temel faktörlerdir. Bu çalışmada kandidemili hasta grubunda bazı sitokinlerin düzeyleri incelenmiştir. Kandidemili hasta grubunda TNF- α , IL-6, IL-10, TGF- β sitokinlerinin kontrol gruplarına göre yüksek düzeyde salgılandığı IL-17, IL-2 ve IFN- γ sitokin düzeylerinde ise hasta ve kontrol grupları arasında fark olmadığı görülmüştür.

Fungal enfeksiyonlara karşı savunmada kullanılan doğal, hücresel/humoral bağışıklık mekanizmalarının şekillenmesi, mantarın bir takım özelliklerinin yanı sıra konağın özellikleri ve enfeksiyonun olduğu anatomik bölge ile ilgilidir. Mantarlara karşı bağışık yanıtta, konağın bağışıklık sistemi ile mantarın geliştirdiği birtakım bağışıklık sisteminden kaçış mekanizmaları arasında bir mücadele söz konusudur (4).

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 enfeksiyonlarında konağın bağışık durumu önemli bir rol oynar (49).

Yaptığımız çalışmada, *Candida* infeksiyonu sırasında görülen sitokin profillerindeki değişikliklerin belirlenmesi amacıyla, Th1 yanıtının göstergesi olarak TNF- α , IFN- γ , IL-2, Th2 yanıtının göstergesi olarak IL-10, TGF- β , IL-6, Th17 yanıtının göstergesi olarak da IL-17 sitokinin ifadenmesi incelenmiştir, Elde edilen veriler sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Daha önce yapılan çalışmaların çoğunda, hayvan deney modellerinde *C.albicans* infeksiyonunda serumda sitokin düzeyleri veya yüzeysel *Candida* infeksiyonlu bireylerdeki sitokin düzey değişiklikleri araştırılmıştır..

Steinshamn ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada normal ve granülositopenik farelerde oluşturulan *C.albicans* infeksiyonunda proinflamatuvar sitokin olan TNF- α ve benzer çalışmalarda proinflamatuvar bazılarında antiinflamatuvar sitokin olarak tanımlanan IL-6 düzeyleri araştırılmıştır. Steinshamn'ın çalışmasında, granülositopenik farelerin serumlarında TNF- α ve IL-6 düzeylerinin normal farelere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. 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 (50).

Yapılan 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 direkt antikandidal etkisinin olmadığı gösterilmiştir (51).

Kalkancı'nın yaptığı tez çalışmasında da deney hayvanlarında değişik *Candida* türlerinin TNF- α düzeylerinde belirgin bir artışa neden olduğu belirlenmiştir (52).

Çağlar ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada farelerde deneysel aspergilloz modeli oluşturulmuş ve altıncı günde TNF- α mRNA ifadenmesi gösterilmiştir. TNF- α 'nın düzeylerinin kontrollere göre yüksek bulunması ile bu sitokinin hem erken hem de geç dönemde salgılandığı sonucuna varmışlardır (53).

Çalışmamızda TNF- α ve IL-6 ifadenmesinin *Candida* PZR pozitif olan bağışık sistemi baskılanmış hasta grubunda *Candida* PZR negatif bağışıklığı baskılanmış kontrol grubuna ve sağlıklı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı arttığı 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. IL-6'nın TNF- α yapımını arttırdığı da pek çok çalışma ile gösterilmiş fakat artış mekanizmasına herhangi bir açıklama getirilememiştir.

IL-10 bakteriyel ve fungal infeksiyonlarda aşırı inflamasyonu önlemede ve antimikrobiyal savunmanın oluşumunda önemli olan antiinflamatuvar bir sitokindir (54).

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 bildirmişlerdir (55).

Schaller ve arkadaşlarının farelerde yaptıkları deneylerde, infekte olmayan hayvanlarda oral mukozada düşük seviyelerde IFN- γ , TNF- α , IL-6 ve IL-10 düzeyi bulmuşlarken; kandidozulu PMN eksikliği olan hayvanlarda IFN- γ , TNF- α , IL-6 seviyelerinde artış, IL-10 seviyesinde değişiklik olmadığını belirlemişlerdir. Ayrıca PMN ilavesi ile birlikte artan IFN- γ , TNF- α , azalan IL-10 seviyeleri belirlemişlerdir (56).

Gasparoto ve arkadaşlarının yaptıkları bir hayvan deneyi çalışmasında fareleri intraperitoneal olarak *C.albicans* ile infekte etmişler ve infeksiyondan sonraki ilk 6 saat içerisinde IL-10 düzeyinin düşük seyrettiğini sonraki 24 saat içinde IL-10 seviyesinin yükseldiğini bulmuşlardır. Bu sonucu da eksudadaki makrofaj ve nötrofil miktarının zaman içerisinde artıp IL-10 seviyesini yükseltmesine bağlamışlardır (57).

Netea ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada TLR2 (Toll-like reseptör) defektli *C.albicans* ile infekte farelerde proinflamatuvar sitokinlerin düzeyleri normal bulunmuşken, IL-10 salınımının defektli farelerde tamamen bozuk olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak *C.albicans*'ın TLR2 derivesi sinyaller aracılığı ile IL-10 seviyelerini arttırdığı ve immünsüpresyon meydana getirdiğini bildirmişlerdir (58).

IFN- γ makrofaj aktive edici özelliği iyi bilinen bir sitokindir (54). Çalışmamızda ise hasta ve kontrol grupları arasında IFN- γ ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

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 gösterilmiştir (59).

Marodi ve arkadaşlarının yaptığı in vitro bir çalışmada monositlerden elde edilen makrofajların kandidasidal aktivitesinde IFN- γ 'nın rolü araştırılmıştır. Çalışmada opsonize ve opsonize olmamış *C. albicans* kullanılmış ve IFN- γ 'nın monosit/makrofajların kandidasidal aktivitesini artırıp artırmadığını incelenmiştir; sonuçta, IFN- γ 'nın bu hücrelerin kandidasidal aktivitesini opsonize veya opsonize olmamış durumda artırdığını gösterilmiştir. Zamanla hücre kültüründe hem fagosit edilen *Candida* sayısının arttığı, hem de salınan sitokinin düzeylerinde artış görüldüğü belirlenmiştir (60).

Steele ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada insan oral ve vajinal epitelyum hücrelerinin *Candida albicans* ile karşılaştıktan sonraki sitokin profillerini incelemişlerdir. Bu çalışmada IFN- γ , TGF- β , IL-10, IL-12 değerlerinde herhangi bir artış saptanmamış olup, oral yada vajinal epitelyum hücrelerinden en az biri 24. veya 96. saatlerde TNF- α , IL-1 α , IL-6, MCP-1 ve IL-8 gibi sitokinlerin düzeyinin arttığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılara IFN- γ , TGF- β , IL-10, IL-12 düzeylerinde herhangi bir artış olmaması mukozal, *C. albicans* infeksiyonları

esnasında bu sitokinlerin epitelyal hücre dışındaki bir takım hücrelerden salgılanıyor olabileceğini düşündürmüştür (61).

Bizim çalışmamızda da hasta grubunda kontrol gruplarına göre IL-10 düzeyleri artmış olarak bulunmuştur. IL-10 aslında bir sitokin sentez inhibitörüdür, geç dönemde salgılanır. IL-10, IL-2 ve IFN- γ 'nın yapımını baskılar. Yaptığımız çalışmanın sonucunda da hasta grubunda IL-10 seviyeleri yüksek bulunmuşken, IL-2 ve IFN- γ düzeylerinde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu durum muhtemelen IL-10'un IL-2 ve IFN- γ düzeylerini baskılaması sonucu olabilir. Bu da *Candida* PZR pozitif hasta grubunun örnekleri ile kontrol grupları arasında anlamlı değişiklik olmamasını açıklamaktadır. Ayrıca; IL-10 Th2 yanıtını temsil eden sitokinlerden biridir ve Th1 sitokinlerine oranla daha geç zamanda salgılanır. Bu nedenle çalışmamızda IL-10 seviyesinin yüksek, IFN- γ ve IL-2 seviyelerinin düşük bulunmasının bir diğer nedeni kandidemisi olan hastalardan enfeksiyonun geç dönemlerinde kan alınıp çalışmanın bu serumlar üzerinden yürütülmüş olması olabilir.

TGF- β immün yanıtlarda genel olarak inhibitör görev üstlenir, T hücre aktivasyonunu inhibe eder.

Spaccapelo ve arkadaşları duyarlı veya dirençli *C.albicans* ile enfekte fare modellerinde yaptığı deneyde TGF- β 'nın etkinliğini değerlendirmeye çalışmışlardır. Çalışmalarında, canlı maya hücreleri enjekte edilen farelerde TGF- β 'nın nekahat döneminde arttığını, iyileşemeyen fare grubunda azaldığını gözlemlemişlerdir (62).

Letterio ve arkadaşları *C.albicans*'ın dokuya invazyonu ile birlikte lenfosit ve diğer mononükleer hücrelerde farklılaşma ve fonksiyonlarında değişim varlığını göstermek amacıyla yaptıkları deneylerde, TGF- β 'nın fagositler üzerindeki etkinliği ve sistemik kandidiyazis patogenezindeki rolünü araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmanın sonucunda *C.albicans* ile enfeksiyona karşı hepatosit ve enfekte mononükleer hücrelerden TGF- β salınarak hastalığın ilerleyişi sağlanmaya çalışılmaktadır (63).

Bizim çalışmamızda da TGF- β seviyeleri hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. TGF- β 'da aslında anti-sitokin etkiye sahiptir. TGF- β 'nın Th hücre farklılaşmasına etkisi oldukça karmaşıktır. Daha önce yapılmış çalışmalar TGF- β 'nın IL-12'nin indüklediği Th1 gelişimini ve IFN- γ yapımını engellediğini göstermiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ise IL-4 ve TGF- β karışımının Th1 ve Th2 uyarımını konsantrasyona bağlı olarak etkileyebileceğini savunmuştur. TGF- β , sistemik kandidiyaza karşı oluşan konak savunmasında önemli bir role sahiptir, fagositik hücreler üzerindeki baskılayıcı tavrı ile etkili bir şekilde hücre aracılı immüniteyi de baskılamaktadır, bu durum çalışmamızda immün sistemi baskılanmış bireylerde TGF- β artışının olmasını açıklayabilir.

IL-17 *Candida* infeksiyonları esnasında konak savunmasını uyaran anahtar sitokinlerden biridir.

Conti ve ark. oral kandidoza karşı mukozal konak savunmasında, Th17 hücrelerinin ve IL-17 reseptör sinyalinin gerekliliğini araştırmışlardır. Th17 ailesinin nötrofil ve antimikrobiyal faktörlerle oral kandidoza baskın cevabı oluşturanın büyük ölçüde IL-17 sitokini olduğunu söylemişlerdir (64).

Eyerich ve ark. *Candida* antijenine ve mitojenik uyarılara karşı oluşan T hücre sitokin salınımını analiz etmişlerdir. Çalışmalarında kronik mukokutanöz kandidiyazis (chronic mucocutaneous candidiasis= CMC) hastaları, akut *Candida* enfeksiyonu geçiren hastaları ve sağlıklı bireyleri karşılaştırmışlardır. CMC hastalarında *C. albicans* ya da mitojen ile uyarılan periferik kan mononükleer hücreleri IL-17 ve IL-22, mRNA ve 70 proteinini anlamlı derecede düşük seviyelerde üretmişlerdir. *Candida* ile enfekte immünokomponent hastalardan alınan PBMC' ler IL-17 ve IL-22' yi daha fazla üretmişlerdir (65).

Zelante ve ark. farelerde yaptıkları çalışmada, IL-23 ve IL-17 salınımı sonrasında *C. albicans* ve *Aspergillus fumigatus* enfeksiyonlarına karşı oluşan direncin büyük bir şekilde artmış olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu da ilgili hedef organda fungal büyüme azalması olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada sunulan veriler fungal enfeksiyonlarında konak savunma mekanizmaları için Th17 hücrelerini ve IL-23 için daha önceden tanımlanmayan rolünü göstermek açısından önemli bulunmuştur. Bu sonuçların, etkili bir immün yanıtı oluşturmak için inflamasyonu sınırlamada ve mantar enfeksiyonlarının tedavisinde yeni stratejiler geliştirilmesinde fikir verebileceği düşünülmüştür (66).

Yaptığımız çalışmada IL-17 seviyeleri için hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Aslında bu sonuç immün sistemi baskılanmış olan hasta grubu düşünüldüğünde şaşırtıcı değildir. Bunun sebeplerinden biri *Candida*'nın konak triptofan metabolizmasının dengesini bozarak, konak bağışıklık sistemi üzerinde immünmodülatör etki gösterebilmesi, diğer bir sebep de üzerinde çalışılan hastaların bağışıklık sistemlerinin

baskılanmış olmasıdır. Çünkü bağışıklık sistemi sağlam bireylerde hemen fagositoz olması ve *C.albicans*'ın intrasellüler olarak öldürülebilmesi triptofan metabolizmasındaki olası değişikliği ve dolayısıyla IL-17'deki inhibisyonu engeller. Oysa bağışık sistemi baskılanmış bireyde *C.albicans* yaşamaya devam eder, triptofan yolağını indükler ve IL-17'i inhibe ederek konak savunmasını daha da zayıf hale getirir (67).

Çalışmamız sonuçlarına göre *Candida* enfeksiyonun erken dönemlerinde Th1 tip yanıtın oluştuğu ve immünsupresyona ve nötropeniye bağlı olarak bu yanıtın yavaş yavaş baskılanıp, Th2 yanıtının etkin hale geldiği düşünülmektedir. Ayrıca Th2 yanıtının Th1 yanıtını baskılayarak *Candida* enfeksiyonuna karşı korunmada negatif bir etki oluşturabileceği de akılda tutulması gereken olasılıklardan biridir.

Farelerle yapılan birçok araştırmada etkin bir Th1 cevabı için aynı zamanda Th2 sitokinlerinden bazılarının da artmış olması gerektiği sonucu çıkartılmaktadır (63). Aslında tüm bunlar birlikte düşünüldüğünde naif T hücrelerinin farklılaşmasında multiple yolakların rol oynadığı, bu dengenin nötropenik konaklarda çok hassas olduğu ve terazinin ibresinin her an yön değiştirebileceği bilinmesi gereken bir gerçektir.

Tüm bu çalışmalarda belirtildiği gibi, enfeksiyonlar sırasında Th1 yanıtı ile Th2 yanıtı arasında karşılıklı bir etkileşim mevcuttur. Th1 yanıtı enfeksiyonun erken dönemleri ile artış gösterirken, Th2 yanıtının oluşması ile birlikte Th1 yanıtı baskılanmaktadır.

Çalışmamızda kandidemi tanısı konulmasında PZR yöntemi esas alınmıştır. *Candida* infeksiyonlarının özgün belirti ve bulgularının olmaması ve klasik tanı yöntemlerinin yetersizliği nedeniyle tanıda güçlükler yaşanmaktadır. İFİ insidansındaki artışa paralel olarak yeni geliştirilen antifungal ajanlara rağmen tedavi başarısı halen % 50'ler civarında seyretmektedir. Antifungal tedaviye ne kadar erken başlanabilirse tedavi başarısı o kadar yüksek olmaktadır. Bu noktada erken tanı yöntemleri ön plana çıkmaktadır (10).

Sistemik mantar infeksiyonlarının tanısı hala zor ve sorunludur. Bu infeksiyonlarda görülen klinik bulgular etkene özgü olmadığından tanıya katkıları sınırlıdır, histopatolojik ve radyolojik bulgular tanıya ilişkin önemli ipuçları sağlayabilmekte ancak kesin tanı mikrobiyolojik yöntemlerle konulmaktadır. Fakat konvansiyonel yöntemler yeterli duyarlılığa ve hıza sahip değildir. Kan örneklerinin kültür sonuçları nadiren pozitif çıktığı için hastaların kanlarında mantar saptamada yüksek duyarlıklılık yöntemler gerekli hale gelmiştir. Kültür, kesin tanı için altın standart olmakla beraber zor ve zaman alıcıdır. Kültürün en önemli avantajı cins ve tür düzeyinde tanımlama yapılabilmesi ve olası direncin gösterilmesi için antifungal duyarlılık testlerinin yapılmasına olanak sağlamasıdır (43).

Son yıllarda galaktomannan antijen testi, beta-glukan testi ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri İFİ erken tanısını sağlama potansiyeline sahip yöntemler gibi görünmektedir (10).

Candida antijenleri ya da bu antijenlere karşı geliştirilen antikorların serolojik tespiti ile erken tanı konulabilir. Mannan antijeni özgül olmasına

rağmen serum ömrü oldukça kısadır ve antikorlara hızla bağlandığı için serodiagnostik açıdan iyi sonuç vermemektedir. Beta-glukan antijeni *Candida* dışında da birçok mantarın hücre duvar yapısında bulunmaktadır ve *Candida*'ya özgü bir test değildir.

PZR ile fungal DNA yapılarının tespit edilmesi de bir diğer tanı yöntemidir. Bu konuda geliştirilen ve deneme sürecinde olan birçok PZR yöntemleri olmasına rağmen henüz pratik kullanıma giren standart bir PZR protokolü yoktur. Pan-fungal primerler ya da *Candida* gibi belli bir mantar türüne yönelik primerler aracılığıyla hasta serum ya da BAL sıvısında fungal enfeksiyon araştırması yapılabilmektedir.

Mansuroğlu ve ark. EO3 geninden seçtikleri 125 baz çifti içeren bir diziyi hedef alan primerler olarak kullandıkları çalışmalarında; kültür ile PZR yöntemini karşılaştırmışlardır. Örnek olarak farelerden kan, böbrek, karaciğer, akciğer, dalak toplanmıştır, test edilen toplam 50 örneğin 50'sini kültür ile 45'ini de PZR yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Fare karaciğer, akciğer, böbrek örneklerinde kültür ile PZR yöntemi arasında %100 uyum bulunmuş, ancak kan ve dalak örneklerinde kültür ile üreme saptandığı halde PZR yöntemi ile negatif sonuçlar alınmıştır. Bu negatifliğin kan ve dalakta fazla miktarda bulunan hemoglobinin inhibitör etkisine bağlı olabileceğini düşünmüşlerdir (68).

Kan tarafından 1993 yılında, 32P-işaretli oligomer probun hibridizasyonu ile saptanan *Candida* aktin geninin 158 bp'lik segmentini çoğaltan primerleri kullandıkları, klinik olarak önemli *Candida* türlerine spesifik

PZR yöntemini tanımlamışlardır. Farelerin kanları çeşitli günlerde toplanmış ve kan kültürü ile PZR %100 uyumlu bulunmuştur (69).

Kalkancı ve ark. 2003 yılındaki çalışmalarında, nötropenik hastalardan alınan kan örneklerinde 5S rDNA bölgesinden seçilen sentetik oligonükleotit primerleri (Pcon1 ve Pcon2) kullandıkları PZR yöntemi ile *Candida* türlerine ait DNA araştırmışlardır. Otuziki hastanın dördünde (%12.5) *Candida* DNA'sı pozitif bulunmuş ve PZR'ı pozitif olan bu dört hastanın BACTEC otomatize sistemi ile yapılan kan kültürlerinde sadece bir hastada pozitif sonuç elde edilmiştir. Ayrıca pozitif bulunan hasta örneklerinden bir tanesinde *Candida* DNA'sının Amfoterisin B tedavisi başlanmasından sonraki 10. günde, tedaviye flukonazol eklenmesinden sonraki beşinci günde negatifleştiği görülmüştür ve kan kültürünün bu dönemde yol gösterici olmadığı vurgulanmıştır. Bu nedenle PCR yönteminin kandidemi tanısı yanında antifungal tedavinin takibinde de kullanılabileceğini bildirmişlerdir (70).

PZR erken tanı ve antifungal tedaviye karar açısından kullanışlı ve faydalıdır. PZR yöntemi az miktarda kana ihtiyaç duyması ve sonuçların çabuk elde edilmesinden dolayı özellikle yeni doğanlarda faydalı bir tanı yöntemi olarak kullanılabilir (71). Moleküler tanı yöntemleri doğrudan dokudan veya vücut sıvısı örneklerinden *Candida* infeksiyonunun hızlı bir şekilde teşhis edilmesi için ümit verici görünmektedir ancak yanlış pozitif sonuçlar oluşabilir ve standardize ticari metodlar mevcut değildir (43).

Kandidalar fırsatçı patojenlerdir ve kandidemi hastalarında ortak bulgu immün sistemdeki bir defektin mevcut olmasıdır. Özellikle T hücrelerinin

fonksiyon dışı kalması kandida infeksiyonları için davet edici niteliktedir. Çalışmamızda da hasta grubunu ve 1. kontrol grubunu *Candida* infeksiyonları açısından risk taşıyan immün sistemi baskılanmış hastalardan oluşturduk ve çalışmanın sonucunda Th2 yanıtını gösteren IL-10, IL-6, TGF- β düzeylerinin, Th1 yanıtını gösteren TNF- α 'nın ifadelenmesinin de kontrol gruplarına kıyasla hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını gözlemledik. Bu sonuçlar ışığında kazanılmış bağışıklıkta Th1/Th2 dengesinin *Candida* infeksiyonunun iyileşmesi veya ilerlemesi açısından kritik öneminin olduğu ve Th2 yanıtının bu hasta grubunda baskın olmasının enfeksiyonun yaygınlaşması ve mortaliteyi yükseltmesi ile ilişkisi olabileceği düşünülmüştür.

İmmün suprese hastalarda görülen *Candida* infeksiyonundaki sitokin profilinin tam olarak belirlenebilmesi, bu infeksiyonlardan korunmada ve tedavisinde yeni seçeneklerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

6. SONUÇLAR

1. *Candida* PZR pozitif immün süprese hasta grubunda ELISA yöntemi ile TNF- α sitokin düzeyi kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
2. *Candida* PZR pozitif immün süprese hasta grubunda ELISA yöntemi ile IL-10 sitokin düzeyi kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
3. *Candida* PZR pozitif immün süprese hasta grubunda ELISA yöntemi ile IL-6 sitokin düzeyi kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
4. *Candida* PZR pozitif immün süprese hasta grubunda ELISA yöntemi ile TGF- β sitokin düzeyi kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
5. *Candida* PZR pozitif immün süprese hasta grubu ve kontrol grupları arasında IL-17, IL-2 ve IFN- γ sitokin ekspresyonları açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır.
6. Hasta grubu ve 1.kontrol grubunda hastaların kullanmış oldukları antifungal ilaçlar sitokin profillerinde anlamlı bir değişiklik yaratmamıştır ($p>0.005$).
7. Hasta grubu ve 1.kontrol grubunda hastaların kullanmış oldukları antiviral ilaçlar sitokin profillerinde anlamlı bir değişiklik yaratmamıştır ($p>0.005$).

8. Hasta grubu ve 1.kontrol grubunda hastaların kullanmış oldukları antibiyotikler sitokin profillerinde anlamlı bir değişiklik yaratmamıştır ($p>0.005$).
9. Hasta grubu ve 1.kontrol grubundaki hastaların sitokin değişiklikleri tanıları açısından analiz edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamıştır ($p>0.005$).
10. Çalışmaya alınan hastalarda kadın-erkek oranı açısından sitokin ekspresyonunda anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.005$).
11. Çalışmaya dahil edilen hastalarda yaş dağılımı açısından sitokin düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.005$).

7. KAYNAKLAR

1. Edwards JE. *Candida* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th edition. New York: Churchill Livingstone, 1995; 2289-305.
2. Ustaçelebi Œ (Ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: GneŒ Kitabevi, 1999
3. Özbal Y. Temel İmmünoloji. 2. baskı, İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri, 2000.
4. Abbas AK, Lichtman AH (Eds). Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2003.
5. Kılıçturgay K (Ed), İmmünoloji. 3 baskı. Bursa: Nobel&GneŒ Yayınevi, 2003.
6. Bilgehan H. Temel Mikrobiyoloji ve BaėıŒıklık Bilimi. 10.baskı. İzmir: BarıŒ yayınları, 2002.
7. Piriciler M. Maya mantarlarının tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılığı. Uzmanlık tezi, On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 1995.
8. Hoog GS, Gene' GJ, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi. 2nd edition. Universitat Rovira i Virgili, 2000.
9. Topcu Willke A. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. In: Topcu Willke A, Söyletir G, Doğanay M. (Edt). *Candida* Enfeksiyonları. 2.cilt, 3.baskı, Ankara: Nobel Kitabevi, 2008.

10. Akan H, Akan Ö, Akova M, Arıkan S, Aygün G, Korten V, ve ark. İmmün Sistemi Baskılanmış Hastalarda İnvaziv Fungal İnfeksiyonlar. 1.baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2006.
11. Kalkancı A, Dizbay M, Turan O, Fidan I, Yalçın B, Hirfanoğlu I, Kuştimur S, Aktaş F, Sugita T. Nosocomial transmission of *Candida Pelliculosa* fungemia in a pediatric intensive care unit and review of the literature. Turk J Pediatr 2010; 52 (1): 42-9.
12. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. Pathogenicity determinants of *Candida*. Cerrahpasa J Med 2000; 31: 172-86.
13. Tiş R. *Candida* türlerinin restriksiyon enzim analizi ile identifikasyonu. Uzmanlık Tezi. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 2007.
14. Chaffin LW, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gazalbo D, Martinez J. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function, and expression. American Society for Microbiology 1998 March; 62(1): 130-80.
15. Whiteway M, Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. Annu Rev Microbiol 2007; 61: 529- 53.
16. Culter JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. Annu, Rev, Microbiol, 1991; 45: 187.
17. Yun-Liang Yang. Virulence factors of *Candida* species. J Microbiol Immunol Infect 2003; 36: 223.

18. Knight SA, Vilaire G, Lesuisse E, Dancis A. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infect Immun* 2005; 73: 5482-92.
19. Pabuççuoğlu U. Mikozlar. 1.baskı. İzmir: Güven Kitabevi, 2000: 96-7.
20. Segal E. *Candida*, stil number one-what do we know and where are we going from there? *Mycoses* 2005; 48 (sup): 3.
21. Shoham S, Levitz S. The immune response to fungal infection. *Br J Haematol* 2005; 129: 569-82.
22. Erdal B. Kandidozlu fare modelinde IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 salınımının enzime bağlı immunosorbent yöntem (ELISA) ile gösterilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara:Gazi Üniversitesi; 2007.
23. Gülmezoğlu E, Ergüven S, İmünoloji. Ankara: Hacettepe taş, 1994.
24. Roth D, Male D, Roitt I, Brostoff J. İmir T (Ed). İmmünoloji. 1.baskı. Ankara: Palme Yayıncılık, 2008.
25. Pietro P, Hussell T, Openshaw J.M. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immun Meth* 2000; 243: 107-24.
26. Us D. Serolojik Tanı Yöntemleri. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 2000; 33-39.
27. Vazquez JA, Sobel JD. Candidiasis. In: Dismukes WE (Edt). *Clinical Mycology*. Oxford: Oxford University Press, 2003; 143-87.
28. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. *Candida*. In: Anaissie EJ (Edt). *Clinical Mycology*. New York: Churchill Livingstone; 2003. 195-239.

29. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005, 17(1): 1-14.
30. Rippon JW. *Medical Mycology The Pathogenic Fungi and The Pathogenic Actinomycetes: Candidiasis and the pathogenic yeasts* 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1982: 487-518.
31. Barr CE, Torosian JP. Oral manifestations in patients with AIDS or AIDS-related complex. *Lancet* 1986; 2:288.
32. Richardson DM, Warnock WD. *Fungal Infection Diagnosis and Management: Superficial candidosis*. 2nd ed. United Kingdom: Blackwell Science, 1997: 78-94.
33. Van der Pas H. Candidamycosis in Gynaecology. In: Tümbay E, Seeliger HPR, Anđ Ö eds. *Candida and Candidamycosis*. New York: Plenum Press, 1991: 73-82
34. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology: Candidiasis USA*: Lea&Febiger, 1992: 280-326.
35. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y (Edt). *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyum Kitapçığı*. Eskişehir; 2002.
36. Krishna R, Amuh D, Lowder CY, ve ark. Should all patients with candidemia have an ophthalmic examination to rule out ocular candidiasis? *Eye* 2000; 14: 30-4.
37. Bodey GP, Luna M. Skin lesions associated with disseminated candidiasis. *JAMA* 1974; 229: 1466-8.

38. Uzun Ö. Kanser hastalarında görülen fungal infeksiyonlar. Flora 1998; 3 (Ek) 19:14-26.
39. Arman D, Arslan H, Azap KÖ, Bayındır Y, Büke Ç, Çaaylan R, Ulusoy S, Arman D. Uzun Ö (Ed). Önemli ve Sorunlu Fungal İnfeksiyonlar. 1.baskı Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2006.
40. Tümbay E. *Candida* türleri. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (Edt). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Öncü Basımevi- Güneş Kitabevi, 1999 p. 1081-86.
41. Akan H, Akduman D, Arslan T, Azap A, Çaylan R, Kartal D. Arman D, Odabaşı Z (Edt). 1.baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2009.
42. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.B.D. Tanısal Moleküler Mikrobiyoloji Teorik ve Uygulamalı Kurs Kitapçığı. 2009.
43. Yalçın B. Sistemik mikoz tanısında kültür dışı yöntemlerin karşılaştırılması ve kitin antijeninin saptanması için ELISA yöntemi geliştirilmesi. Uzmanlık Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2010.
44. Ami B, Lewis R, Kontoyiannis D. Immunopharmacology of modern antifungals. Clinical Infectious Diseases 2008; 47 (2): 226-35.
45. De Pauw BE, Patterson TE. Should the consensus guidelines' specific criteria for the diagnosis of invasive fungal infection be changed? Clin Infect Dis 2005; 41 (sup): 377-80.
46. Meunier E. Prevention and mycoses in immunocompromised patients. Rev Infect Dis 1987; 9: 408-16.

47. Marr KA. Invasive *Candida* infections: The changing epidemiology. *Oncology (Williston Park)* 2004; 18 (14 Sup 13): 9-14.
48. Cordonnier C, Maury S, Pautas C, Bastie JN, et al. Secondary antifungal prophylaxis with voriconazole to adhere to scheduled treatment in leukemic patients and stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation* 2004; 33: 943-8.
49. 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.
50. Steinshmann 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- 8.
51. Gordon MA. Tumor necrosis factor alpha has a protective role in a murine model of systemic candidiasis. *Infection And Immunity* 1994; 62 (7): 2761-2772.
52. Kalkancı A. Tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve platelet aktivator faktör (PAF) etkileşiminin kandidozdaki rolünün farede gösterilmesi. Doktora Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2000.
53. Çağlar K, Kalkancı A, Fidan I, Aydoğan S, Hızal K, Dizbay D, et al. Deneysel pulmoner aspergilloz modelinde interleukin-10, tümör nekroz faktörü-alfa ve interferon-gama ifadenmesinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45 (2): 344-352.

54. Yeşilyurt E. Kandidozlu sıçan modelinde IFN- γ , TNF- α , IL-10 ifadenmesinin ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile gösterilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi; 2007.
55. Roilides E, Anastasiou-Katsiardoni A, Dimitriadou-Georgiadou A, KadiHsoglou 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: 1734-42.
56. Schaller M, Boeld U, Oberbauer S, Hamm G, Hube B, Korting H, et al. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis. Microbiology 2004; 150, 2807-13.
57. Gasparoto T, Gaziri L, Burger E, Almedia R, Felipe I, et al. Apoptosis of phagocytic cells induced by *Candida albicans* and production of IL-10 . Fems Immunology and Medical Microbiology 42 2004; 219-24.
58. Netea M, Sutmuller R, Hermann C, Graaf A, Meer J, Krieken J, et al. Toll-Like Receptor 2 supresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. The Journal of Immunology, 2004; 172: 3712-18.
59. Ka' Poszta R, Tree P, Szlo' Maro' DiL, Gordon S. Charecteristics of invasive candidiosis in gamma interferon- and interleukin-4- deficient mice: Role of macrophages in host defense against *Candida albicans*. Infection and Immunity 1998; 66 (4): 1708-17.

60. Marodi L, Schreiber S, Anderson DC, MacDermott RP, Korchak HM, Johnston RB. 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.
61. Steele C, Fidel PL, et al. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infection and Immunity* Feb 2002; 577-583.
62. Spaccapelo R, Romani L, Tonetti L, Cenci E, Mencacci A, Sero G, et al. TGF- β is important in determining the in vivo patterns of susceptibility or resistance in mice infected with *Candida albicans*. *The Journal of Immunology* 1995; 155: 1349-60.
63. Letterio J, Lehrnbecher T, Pollack G, Walsh T, Chanock S, et al. Invasive candidiasis stimulates hepatocyte and monocyte production of active transforming growth factor β . *Infection and Immunity* Aug 2001; 5115-20.
64. Conti RH, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun NJ, Lindemann JM, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 2009; 206 (2): 299-311.
65. Eyerich K, Foerster S, Rombold S, Seidl PT, Behrendt H, Hofmann H, et al. Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of Th17-associated cytokines IL-17 and IL-22. *Journal of Investigative Dermatology* 2008; 128: 2640-45.

66. Zelante T, Luca A, Bonifazi P, Montagnoli C, Bozza S, Moretti Se, et al. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2695–2706.
67. Cheng S, Veerdonk F, Smeekens S, Joosten L, Meer J, Kullberg B, et al. *Candida albicans* dampens host defense by downregulating IL-17 production. *The Journal Immunology* 2010; 185: 2450-57.
68. Mansuroğlu H, Kustimur S. *C.albicans*'ın fare modelinde kan ve çeşitli organlarda PCR ile gösterilmesi. Uzmanlık Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2000.
69. Kan VL. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *J Infect Dis* 1993; 168 (3): 779-83.
70. Kalkancı A, Kustimur S, Günes , Otlu B. Nötropenik hastalarda invazif *Candida* enfeksiyonunun polimeraz zincir reaksiyonu ile tanısı. *Turkish J Infect* 2003; 17 (2): 171-74.
71. Wheat LJ, Walsh TJ. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27 (4): 245-51.

8. ÖZET

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin daha yaygın kullanımı, organ nakillerinin daha sık yapılması gibi nedenler, bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların ve bu tür hastalarda kandidoz varlığının her geçen gün artış göstermesine neden olmaktadır.

Candida infeksiyonuna karşı oluşan bağışıklıkta birçok faktör rol oynamaktadır. Sitokinler de bunlardan biridir. Çalışmamızda, kandidoz sırasında oluşan immünolojik faktörlerden olan sitokin profillerinde oluşan değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda, kandidoz tanısı PZR ile konulmuş bağışıklık sistemi baskılanmış 20 hasta, bağışıklık sistemi baskılanmış kandidozu olmayan 10 kontrol hastası ve 10 sağlıklı gönüllüden oluşan kontrol grubu oluşturulmuştur. Bu çalışma gruplarında TNF- α , IL-2, TGF- β , IFN- γ , IL-10, IL-6 ve IL-17 sitokinleri ELİSA yöntemiyle değerlendirilmiştir.

Hasta grubunda TNF- α , TGF- β , IL-10 ve IL-6 seviyeleri kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. IL-2 , IFN- γ , IL-17 sitokin düzeylerinde ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Çalışmamızın sonuçlarına göre *Candida* infeksiyonunun erken dönemlerinde Th1 tip yanıtının olduğu ve immünsupresyona bağlı olarak bu yanıtın zamanla azalıp, Th2 yanıtının etkin hale geldiği düşünülmektedir.

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

8. SUMMARY

The incidence of candidemia is growing with the increasing complexity of surgical procedures, the existence of patient populations at higher risk of infection, and the changes in patient demographic characteristics, such as organ transplantation.

Immun responses to defined antigens of *Candida* exist different cellular factors including cytokines. We investigated whether there is an association between cytokine profiles during candidosis. We performed a case-control study involving 20 neutropenic patients with a *Candida* bloodstream infection and, 10 neutropenic patients without *Candida* infection, and 10 healthy controls. TNF- α , IL-2, TGF- β , IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-17 were accessed by ELISA technique.

We observed that the TNF- α , TGF- β , IL-10 and IL-6 levels were found to be higher in patients with *Candida* bloodstream infection than in controls. On the other hand, there was no statistically significant difference between patients and controls in terms of IL-2, IFN- γ , IL-17 levels.

Immunotherapy aimed at enhancement of host defence mechanisms may prove extremely useful. The design of trials of immunotherapy against fungal pathogens requires profound knowledge of the host defense mechanisms involved in invasive fungal infections.

9. TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.	PZR için kullanılan primer ve prob dizileri	53
Tablo 2.	Mantar primerleri kullanarak hazırlanan PZR karışımı	54
Tablo 3.	Çoğaltma protokolü safhaları	55
Tablo 4.	IL-2 ELISA standart konsantrasyonları	57
Tablo 5.	IL-6 ELISA standart konsantrasyonları	58
Tablo 6.	IL-10 ELISA standart konsantrasyonları	59
Tablo 7.	TNF- α ELISA standart konsantrasyonları	60
Tablo 8.	IFN- γ ELISA standart konsantrasyonları	61
Tablo 9.	TGF- β ELISA standart konsantrasyonları	63
Tablo 10.	IL-17 ELISA standart konsantrasyonları	66
Tablo 11.	Grupların Yaş Ortalamaları ve Ortancaları	69
Tablo 12.	Grupların Cinsiyet Dağılımı	70
Tablo 13.	Grupların Bazı Tanımlayıcı Özellikleri	70
Tablo 14.	Gruplar arasında IL-10 serum düzeylerinin karşılaştırılması	71
Tablo 15.	Gruplar arasında TNF- α serum düzeylerinin karşılaştırılması	71
Tablo 16.	Gruplar arasında TGF- β serum düzeylerinin karşılaştırılması	71
Tablo 17.	Gruplar arasında IL-6 serum düzeylerinin karşılaştırılması	72
Tablo 19.	Gruplar arasında IL-17 serum düzeylerinin karşılaştırılması	73
Tablo 20.	Gruplar arasında IFN- γ serum düzeylerinin karşılaştırılması	73

10. GRAFİK LİSTESİ

Sayfa No

- Grafik 1.** TGF β , TNF- α , IL-10, IL-6 sitokin düzeylerinin gruplara göre dağılımı..... 72
- Grafik 2.** IL-2, IFN- γ , IL-17 düzeylerinin gruplara göre dağılımı..... 73

11. ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. Mukozal C.albicans enfeksiyonu esnasında sitokin üretimi.....	24
Şekil 2. Standart seri dilusyonların hazırlanması	65

12. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Sevgi

Soyadı: Özyeğen Aslan

Doğum yeri ve tarihi: Kütahya / 25.04.1978

Eğitimi: 25.05.2007 tarihinde Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. 2005-2006 yılları arasında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak görev yaptım. 2003-2004 yılları arasında Kütahya Çavdarhisar Merkez Sağlık Ocağında görev yaptım. 2002 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldum. 1996 yılında Kütahya Ali Güral Anadolu Lisesinden mezun oldum.

Yabancı Dili: İngilizce

Üye olduğu bilimsel kuruluşlar: Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlar Derneği