

T. C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**KANDİDOZLU SIÇAN BÖBREK DOKULARINDA
IL-17 GEN İFADELENMESİNİN GERÇEK ZAMANLI
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE GÖSTERİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS

Seda USTA

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Işıl Fidan

ANKARA
Aralık 2009

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

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

Tez Savunma Tarihi : 28/12/2009



**Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR
GAZİ Üniversitesi
Jüri Başkanı**



**Doç. Dr Işıl FİDAN
Gazi Üniversitesi**



**Doç.Dr Süreyya BARUN
Gazi Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	I
İçindekiler.....	II
Şekiller, Resimler, Grafikler	VI
Tablolar.....	VII
Kısaltmalar	VIII

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2. 1. Tarihçe	3
2. 2. Taksonomi.....	3
2. 3. Ekoloji.....	3
2. 4. Mikrobiyolojik Özellikleri.....	4
2. 5. Hücre Yapısı	5
2. 5. 1. Hücre Duvarı.....	6
2. 5. 2. Hücre Zarı.....	7
2. 5. 3. Sitoplazma.....	7
2. 6. Virulans Faktörleri	7
2. 6. 1. Yapışma (adherans)	8
2. 6. 2. Çimlenme Borusu	8
2. 6. 3. Dimorfizm.....	9
2. 6. 4. Toksinler	10
2. 6. 5. Enzimler.....	11

2. 6. 6. Biyofilm (Slime) Faktörü.....	13
2. 6. 7. Fenotip Değişimi	14
2. 7. Kandidozda Patogenez.....	15
2. 8. Kandidozda Bağışıklık.....	17
2. 8. 1. Doğal bağışıklık	19
2. 8. 2. Kazanılmış bağışıklık	20
2. 9. Sitokinler	23
2. 9. 1. İnterlökin 17 (IL-17)	26
2. 10. Kandidozda Tanı	28
2. 11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	32
2. 11. 1. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir	34
Reaksiyonu (Reverse Transcriptaz- PCR-RT-PCR)	
2. 11. 2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir.....	34
Reaksiyonu (PZR)	
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3. 1. Gereçler	36
3. 1. 1. Cihazlar.....	36
3. 1. 2. Kimyasallar	37
3. 1. 3. Diğerleri	38
3. 2. Yöntemler	38
3. 2. 1. Suşlar.....	38
3. 2. 2. Hayvan Modeli	38

3. 2. 3. Nötropeni Oluşturulması	39
3. 2. 4. Kandidoz Oluşturulması.....	39
3. 2. 5. Dokuda İnfeksiyonun Gösterilmesi	40
3. 2. 6. Böbrek Dokusu Örneğinden Total.....	41
RNA Eldesi	
3. 2. 7. Ters Transkriptaz PZR (RT-PCR)	43
ile cDNA Eldesi	
3. 2. 8. IL-17' yi kodlayan cDNA' ların Gerçek	45
Zamanlı PZR Cihazında Çoğaltılması	
3. 2. 9. Kontaminasyona Karşı Koruma	49
3. 2. 10. İstatiksel Analiz	49
4. BULGULAR.....	50
4. 1. Nötropenin Gösterilmesi.....	50
4. 2. Kandidozun Doğrulanması	50
4. 3. RNA Varlığının Gösterilmesi	52
4. 4. DNA Varlığının Gösterilmesi	54
4. 5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir	56
Reaksiyonunda IL-17 Gen İfadelemesinin Analizi	
4. 5. 1. Kantitasyon Sonuçları	59
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ.....	73

7. ÖZET	75
8. SUMMARY	77
9. KAYNAKLAR	79
10. EKLER	96
11.ÖZGEÇMİŞ.....	97

ŞEKİLLER, RESİMLER, GRAFİKLER

Şekiller

Şekil 1.1: Naif CD ⁺ 4 T Hücre Farklılaşması	22
---	----

Resimler

Resim 4.1: Kandidoz Oluşturulmuş Deney Hayvanlarında	51
Böbrek Enfeksiyon Odakları	

Grafikler

Grafik 4.1: NanoDrop Analiz Ekranı Örnek	53
RNA Ölçüm Görüntüsü	
Grafik 4.2: NanoDrop Analiz Ekranı Örnek	55
DNA Ölçüm Görüntüsü	
Grafik 4.3: Bütün <i>Candida</i> Örneklerinin	57
Amplifikasyon Eğrileri	
Grafik 4.4: <i>Candida</i> Örneklerinin Amplifikasyon.....	57
Eğrileri	
Grafik 4.5: Üç Farklı <i>Candida</i> Örneğinin	58
Amplifikasyon Eğrileri	
Grafik 4.6: Üç Farklı <i>Candida</i> Örneğinin	58
Amplifikasyon Eğrileri	
Grafik 4.7: Kantitasyonda Yararlanılan Standart.....	60
Eğri	

TABLÖLAR

Tablo 3.1: Kullanılan Primer ve Prob	41
Dizileri	
Tablo 3.2: PCR Reaksiyon Karışımı	44
(1. Tur) (cDNA Eldesi)	
Tablo 3.3: PCR Reaksiyon Karışımı	44
(2. Tur) (cDNA Eldesi)	
Tablo 3.4: IL-17 için Gerçek Zamanlı PZR.....	46
Reaksiyon Karışımı	
Tablo 3.5: IL-17 için Gerçek Zamanlı PZR.....	47
Çalışmasında Kullanılan Primer Dizileri	
Tablo 3.6: Gerçek Zamanlı PZR' da Kullanılan	48
LightCycler Yazılım Raporu	
Tablo 4.1: Kandidozlu Böbrek Dokularından	52
Elde Edilen RNA Miktarları	
Tablo 4.2: RNA' dan RT-PCR ile Elde Edilen	54
cDNA Miktarları	
Tablo 4.3: IL -17 İçin Real-Time PCR Sonuçları	59

KISALTMALAR

- RES:** Retiküloendotelyal sistem
- PZR:** Polimeraz zincir reaksiyonu
- IL:** İnterlökin
- SDA:** Sabouraud dekstroza agar
- MAPK:** Mitojen-aktif eden protein kinaz
- SAP:** Salgısal aspartik asit
- NK:** Doğal öldürücü hücreler
- DH:** Dendritik hücreler
- NO:** Nitrik oksit
- IFN:** İnterferon
- TNF:** Tümör nekroz faktör
- TGF:** Tümör büyüme faktörü
- PMN:** Polimorfonükleer
- Ig:** İmmünoglobulin
- IRF:** İnterferon regülatör faktör
- NFAT:** T hücre nükleer faktörü
- STAT:** Sinyal iletilici ve transkripsiyon aktif edici faktör
- ROR:** Transkripsiyon faktörü
- HE:** Hemotoksilen eozin
- PAS:** Periyodik asit-shiff
- MGB:** Metanomin gümüş boyası
- ELISA:** Enzim bağlı immünsorbent yöntemi

dNTP: deoksinükleotid trifosfat

RT-PCR: Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

Real-Time PCR: Gerçek zamanlı PZR

cDNA: Komplementer DNA

IM: İntramüsküler

Cp: Siklus sayısı

PBMC: Periferel kan mononükleer hücreler

1. GİRİŞ

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

Bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların doğal savunma mekanizmaları işlevlerini tam olarak yerine getiremediği için, sistemik mantar infeksiyonlarına duyarlılıkları da artmaktadır. Bu hastalardaki mantar infeksiyonları; şiddetli, hızlı ilerleyen, tanısı ve tedavisi zor olan infeksiyonlardır. Hastalığın klinik spektrumu derinin yüzeysel infeksiyonundan hayatı tehdit eden sistemik infeksiyonlara kadar değişmektedir.^{1, 2}

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

Mantarlardan ileri gelen infeksiyonlarda vücut, mantar elementlerine karşı immünolojik bir yanıt verir. Bu cevap, bakteriyel antijenlere oranla zayıf olmakla beraber, kendini humoral (sıvısal) ve hücrel bağışık yanıt şeklinde gösterir. Mantar elementlerinin vücuda girmesi ile lenfoid sisteme ait retikuloendotelial sistem (RES) aktive olur ve uyarılır. Hücrel veya humoral yanıtın derecesi ve bunlardan birine ait öncelik sırası, infeksiyonun türüne göre değişir. Bazı hastalıklarda ilk önce deri duyarlılığı oluşur ve bunu deri testleri ile ortaya koymak mümkün olabilir. Diğer hastalıklarda da humoral yanıt daha önce ortaya çıkar.³

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, 4, 5}

Son yıllarda sitokinlerin gösterilmesi için serolojik yöntemler yanında moleküler yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile sitokin ifadesinin gösterilmesi duyarlı ve özgül bir yöntem olarak kullanılmaktadır.

Son yıllarda tanımlanan interlökin-17 (IL-17) sitokininin mantar infeksiyonlarındaki rolü tam olarak bilinmemektedir. Bu yüzden çalışmamızda, invaziv kandidoz oluşturulmuş sıçan böbrek dokularında IL-17 gen ifadelenmesinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Tarihçe

M. Ö. 4. Yüzyılda Hippocrates ve Galen'in oral lezyon olarak tanımladıkları pamukçuğun altta yatan hastalıklar ile ilişkili klinik bir belirti olduğu bilinmekteydi. 1839 yılında Almanya'da Bernard Langenbeck, tifüslü bir hastanın oral lezyonlarından izole ettiği organizmayı "Typhus-Leichen" (tifüs cisimcikleri) olarak tanımlamış, 1841'de Emil Berg tarafından sağlıklı bebeklerde pamukçuğun fungal etiyojisi araştırılmıştır. *Candida albicans* ilk kez 1842'de Gruby tarafından tanımlanmıştır.^{4, 6, 7}

2. 2. Taksonomi

Candida'lar *Deuteromycota*'da *Blastomycetes* sınıfının *Cryptococcales* takımında *Cryptococcaceae* ailesinde sınıflandırılan, blastosporlarla çoğalan, yalancı miçel yapan, gerçek miçel oluşturmaları çok nadir görülen ve eşeyli şekilleri *Hemiascomycetes* sınıfında bulunan bir grup anamorf mayadır. Bugün için kabul edilmiş 200 kadar türü bulunmaktadır.^{8, 9}

En sık infeksiyon oluşturan *C. albicans* dışında, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis*, *C. viswanathii*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondi* ve *C. krusei* diğer önemli *Candida*'lardan bazılarıdır.¹⁰

2. 3. Ekoloji

Candida'lar maya şeklinde üreyen mantarların önemli bir grubudur. Bitkilerde de yaşayabilen *Candida* türleri, insan ve diğer sıcakkanlı hayvanların birçoğunda kommensal olarak bulunur. Geçiş yolu

genellikle yiyecekler, direk temas (giyecekler, yatak, diş fırçaları vb.) yolu ile olmaktadır.^{6, 11, 12}

Candida türleri normalde deri ve mukoza florasında bulunan organizmalardır. *C. albicans* florada en sık bulunan türdür. Normal bireylerin ağız ve sindirim kanalında bulunur. Fırsatçı patojendir. Bazı hazırlayıcı faktörlerin varlığında (konağın bağışıklık sistemi zayıfladığı sırada) “kandidoz” olarak tanımlanan yüzeysel veya derin; akut veya kronik infeksiyonlara neden olur. *Candida* infeksiyonları, bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde (HIV infeksiyonu gibi) yaygın olarak rastlanmaktadır. *C. albicans* florada en sık bulunan türdür.^{6, 7, 12, 13}

2. 4. Mikrobiyolojik Özellikleri

Büyüklüğü 2-6 µm arasında olan *Candida*, tek hücreli, ökaryotik ve kemoheterotrof olup, yuvarlak veya oval biçimdedir. Genellikle tek başına, zincirler oluşturarak ya da küçük yumuşak kümeler şeklinde görünür. Aseksüel yolla tomurcuklanarak (blastokonidya) çoğalma gösterir. Birçok tür, dokuya invaze olduğunda hem yalancı hem de gerçek hif formlarını oluşturur (dimorfizm). Arka arkaya tomurcuklanan blastokonidyaların birbirinden ayrılmayıp uzayarak ve aralarında boğumlar oluşturarak yaptıkları hücre zincirleri yalancı hifleri oluşturur. *C. glabrata* hariç tümü uygun koşullar altında yalancı hif üretir.^{11, 12, 14, 15}

Candida türleri, antibiyotikli (kloramfenikol veya gentamisin içeren) Sabouraud dekstroz agar (SDA)’da pH 4-7’de, 24-42 °C’de, 24-48 saatte üretilir. Ayrıca kanlı agar, beyin-kalp infüzyon agar ve triptoz agar gibi bakteriyolojik ortamlarda da üreyebilir. Genellikle kirli beyaz veya krem rengi, nemli, düzgün veya buruşuk kenarlı, düzgün yüzeysel veya göbekli; uzayan inkübasyonla birlikte kıvrımlı hale gelen, mat ya da parlak,

maya kokulu yumuşak koloniler oluştururlar. Besiyeri yüzeyinin altında ise yalancı hifler bulunur.^{14, 16, 17}

Tüm *Candida* türleri glukozu fermente eder, hiçbirisi nitrati asimile edemez. Sadece *C. guilliermondii* dulsitolü ve *C. krusei* laktozu asimile eder. *Candida* türleri genellikle üreaz üretmez ve KNO₃'ü kullanmaz, ancak bazı *C. krusei* izolatları üreaz pozitif olabilir. Bu gruptaki maya benzeri mantarların kültürlerinde etanol, asetoin ve asetik asit, formik asit, laktik asit, propionik asit, piruvik asit, süksinik asit gibi organik asitlerden zengin metabolik son ürünler oluşur.^{2, 18}

C. albicans' ı diğer *Candida*'lardan ayıran en önemli özelliği germ tüp deneyinin pozitif olmasıdır. Serum içinde 37°C'de 2 saat inkübe edilirse, germ tüp (çimlenme borusu) oluşumu gözlenir. Ancak *C. stellatoidea* ve *C. dubliniensis* de germ tüp oluşturduğu için bu test ile yanlış pozitif sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. *C. albicans*'ı morfolojik olarak tanımaya yarayan diğer bir yol ise mısır unu-Tween 80 agarda oluşturduğu tipik iri, küre şeklindeki klamidosporeleri görmektir.^{6, 7, 12, 13, 19, 20}

2. 5. Hücre Yapısı

Mantar hücresi ökaryot hücre özelliğinde olup içte nükleus ve organelleri içeren sitoplazma, sitoplazma zarı dışta hücre duvarı ve bazı türlerde görülen kapsülü bulundurur.^{5, 6, 7, 12, 19}

2. 5. 1. Hücre Duvarı

Hücre duvarı hücre morfolojisini korumak, hücreyi desteklemek, savunmak için gereklidir. Duvar sayesinde dış ortamda meydana gelen ozmotik değişikliklerden hücre korunur. Geçirgen bir bariyer olan hücre duvarı, hücre içi madde geçirgenliğini de ayarlamakta ve hücrenin bir araya gelerek yığın oluşturması (flokkulasyon), seksüel aglütinasyon gibi yapısal olaylarda hücre-hücre etkileşimlerinde başrol oynamaktadır.²¹

Hücre duvarı hücrelerin plazma membranını dıştan saran yaklaşık 100- 200 nm kalınlığında bir örtüdür. Hücre duvarı glukanlar, mannoproteinler ve kitinden oluşmaktadır. Duvar yapısında majör komponent β -Glukandır (β -Glukanlar β -1,3 Glukan veya β -1,6 Glukan olarak veya her ikisi bir arada olarak bulunmaktadır). Hücre duvarının dayanıklılığını glukanlar sağlarlar ve mikrofibriler yapıda şekillenmişlerdir. Hücre duvarı β -1,3 Glukan ve kitin tabakası halindedir. Bu tabakanın dış yüzeyine mannoproteinler yapışmıştır. Mannoproteinler hücre geçirgenliğinde önemlidir fakat aglütininler ve flokkulinler gibi davranarak yapısal proteinler olarak görev yapabilirler. Kitin N- Asetilglukozamin'in bir polimeridir ve maya hücre duvarlarının yalnızca %2-4 kadarını oluşturur. Genellikle kitin mayalarda tomurcuklanma izi çevresinde lokalize olmaktadır. Bazı pseudohifsel gelişim gösteren mayalarda (*C. albicans* gibi) hücre duvar içeriğinde kitin miktarı fazladır. Bazı maya türlerinde de kitin bulunmamaktadır. Hücre duvar yapısının diğer komponentleri ise proteinler, lipitler ve inorganik fosfattır.²¹

2. 5. 2. Hücre Zarı

İki tabakalı bir zardır. Fosfolipid, sifingolipid, glikoprotein, protein ve sterol içerir. Memeli hücreesindeki kolesterolden farklı olarak ergosterol yapısındadır. Bu özellik polien grubu antifungal ilaçların başarılı bir şekilde kullanımını sağlar. Lipidlerin patojenik mantarlarda virulansın ve dimorfizmin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

Hücre zarı sıvı ve besinlerin difüzyonunu, aminoasit ve şekerlerin enerjiye bağımlı veya bağımsız geçirgenliğini kontrol eder; sitoplazmayı korur; hücre duvarı ile kapsüller materyalin sentezini sağlar.^{7, 12, 13, 20}

2. 5. 3. Sitoplazma

Maya hücrelerinde etrafında nükleer membran bulunan çekirdek bulunur. Nükleolus RNA açısından zengindir. Sitoplazmada golgi cihazı, 80s ribozomu, hidrolitik ve sindirim enzimlerini içeren vakuoller, lipid ve glikojen granülleri, mikroflament ve mikrotübüller bulunur.^{6, 12, 13, 17, 20, 22}

2. 6. Virulans Faktörleri

İnsanların çoğunda yaşamları boyunca *Candida* enfeksiyonuna karşı "doğal direnç" vardır. Konak hücre hasarını *Candida*'ların virulans faktörleri ve mantara karşı savunma mekanizmaları aracılığı ile verilen konak immün yanıtını belirler. *Candida*'ların türüne ve kökenine bağlı olan bazı faktörler konağın bağışıklığını yenmek için birlikte rol oynarlar. Patojenite kriterleri denilen bu faktörler *C. albicans* ve diğer

Candida türlerinin virulansını belirler. Virulans faktörlerinin önemi en iyi *C. albicans* türünde gösterilmiştir.²³

2. 6. 1. Yapışma (Adherens)

Kandidozda ilk basamak *Candida*'nın konak hücreye tutunması, yani adezyonudur.²⁴ Yapışma, hücrelerin yüzey özellikleri ile ilişkilidir. *Candida*'ların mukoza epitel ve endotel hücrelerine yapışması kolonizasyonun da ilk aşamasıdır.^{20, 24} *Candida* kökenleri epitelyum hücreleri, mukoza endotel hücreleri, santral venöz kateterler ve bütün sentetik materyale (protezler, yapay kalp kapakçık yüzeyleri) yapışma eğilimindedirler.²⁴

C. albicans'ı bu cins içerisinde en sık karşılaşılan tür olarak öne çıkaran özelliklerin başında mukoza yüzeylerine yapışma yeteneği gelir. Epitele tutunma, *Candida* mannan proteinleri ile olmaktadır. Endotele tutunma ise ekstraselüler matriksteki fibronektin, kollagen I ve IV ve laminin ile olmaktadır.^{10, 24} *Candida*' lar bu proteinlere tutunabilmektedir. İyon-iyon ilişkisi ve hidrofobisite gibi özgül olmayan adezyon mekanizmaları da vardır.²⁴ *Candida*' ların konak dokuya tutunması blastospor fazında daha fazladır. Ortamda şeker (galaktoz) veya 2 değerlikli iyonlar (Mg^{++} , Ca^{++}) bulunduğunda tutunması artar.¹⁰

2. 6. 2. Çimlenme borusu

İnfekte dokularda *C. albicans*'ın hem maya hem de miçelli şekli bulunsa da hif şeklinin aktif semptomlu infeksiyonla ilişkili olduğu, saprofit *C. albicans*'ın hemen daima maya şeklinde olduğu, çimlenmekte olan miçelli hücrelerin daha virülan olduğu belirtilmiştir. Çimlenme ile yapışma arasındaki ilişki ve maya ve hifli formların epitel hücrelerine

bağlanmasındaki farklılık üzerinde yapılan çalışmalarda, çimlenme borusunun ağız epiteline daha iyi bağlanmayı sağladığı, buna karşın boru oluşumunun baskılanmasının bağlanmayı azalttığı gösterilmiştir. Çimlenmiş hücrelerin dokuya blastosporlardan 50 kez daha fazla yapıştıkları; buna göre en iyi hifli şeklin bağlanabildiği belirtilmiştir. Ayrıca, çimlenme borusunun ilave fibrilli yüzey tabakaları meydana getirdiği ve bundan dolayı çimlenmiş hücrelerin de çimlenmemiş mayalara göre daha fazla bağlanma gösterdikleri bildirilmiştir.²⁰

Hem blastosporlar hem de çimlenme borusu mantarın bulunduğu yüzeyi kaplayıp, invazyonunu sağlayabilir. Ancak, bunun sağlanması için çimlenme borusu koşul da değildir. Fare deneylerinde çimlenmenin adherens olayının başlamasını uyardığı fakat eksikliğinin invazyonu önlemediği gösterilmiştir. Ancak tek başına adherensin hastalığın başlamasından sorumlu olması nadirdir ve *Candida* infeksiyonunun patogeneğinde diğer faktörleri de düşünmek gerekir.²⁰

2. 6. 3. Dimorfizm

C. albicans kültürde tomurcuklanan oval maya hücreleri (blastokonidya) ve uzun 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 blastokonidya kümeleri üreterek maya şeklinde de gelişebilirler. Sıcaklık, pH ve besiyeri gibi ortam koşulları gelişecek fenotipi belirler.²⁰

Miçelli şekil ile infeksiyon arasında sebep sonuç ilişkisi, hifin dokuya maya hücresinden daha kolay penetre olmasına, hifin sindirilmesinin daha güç gerçekleşmesine ve lezyonlardan alınan

materyalde de *C. albicans*'ın genellikle hif formunda gözlemlenmesine dayandırılmaktadır. Ancak maya şeklinin virülansının arttığını ortaya koyan deliller de vardır.²⁰

C. albicans kökenlerinin genelde besiyerlerinde 25°C'de boyut, biçim ve rengi kolayca ayırt edilebilen, beyaz ve opak olarak tanımlanan iki fenotip arasında geri dönüşümlü olarak fenotipik değişim gösterebildikleri bilinmektedir. Konağa girmeden önce maya fazında (Y fazı) olan *C. albicans* konak dokuya temas ettikten bir süre sonra hastalık yapan hif fazına (M fazı) geçer.^{7, 24}

M fazına geçişi indükleyen iki uyarı tespit edilmiştir: 1) Mitojen-aktive eden protein kinaz yolu (mitogen activated protein kinaz (MAPK)) (*Cph1p*), 2) cAMP-bağımlı aktivasyon yolu (*Efg1p*). Bu indüksiyon mekanizmaları *C. albicans*'ın SAP5 geni tarafından kontrol edilir. SAP5 geni bulunmayan mutantlar avirulandır ve daima Y fazında kalır.^{5, 24}

2. 6. 4. Toksinler

C. albicans'ın mayamsı fazında endotoksine benzer maddeler ve hemolizin üretimi gösterilmiştir.²⁰

C. albicans ' ın toksinleri, yüksek molekül ağırlıklı olanlar ve düşük molekül ağırlıklı olanlar olmak üzere iki grupta toplanır.^{7, 17, 20}

2. 6. 4. a. Yüksek Molekül Ağırlıklı Toksinler: Glikoprotein toksinler ve kanditoksindir. Glikoprotein toksinler, toksik bileşikler olarak karbonhidratlar (mannoz, glikoz) ve protein içeren maddelerdir. Glikoprotein molekülünün hem protein hem de şekerlerinin toksik etki için

gerekli olduğu, bu etkide başlıca rolü mannanın oynadığı ve proteinin yardımcı olduğu öne sürülmüştür. Kandidoksin ise virülan bir *C. albicans* kökeninden elde edilmiştir ve farelere damar içine enjekte edildiğinde öldürücüdür.^{7, 12, 20}

2. 6. 4. b. Düşük Molekül Ağırlıklı Toksinler: Bu toksinler kandidoksin üreten *C. albicans* kökeninden elde edilmiştir. Bu toksinler şoka neden olur ve ölümcül etkinlikle yakından ilgilidir.^{12, 20}

Toksinlerin patojenlik belirtgeni olarak rol oynadığı hem hayvan deneylerinden hem de klinik gözlemlerden çıkarılmıştır.²⁰

2. 6. 5. Enzimler

Mantarlar konağın hücre zarlarında işlev bozukluğuna sebep olarak dokuda ilerlemelerine yardımcı olan enzimler oluşturma yeteneğine sahiptirler. Zarlar lipid ve proteinlerden yapılmış olduklarından bu biyokimya maddeleri enzimlerin hedefini oluştururlar. Patojen mantarlar tarafından üretilen böyle enzimler hemen hemen yalnızca *C. albicans*'la ilgili olarak bildirilmiştir. Bu mantarın salgıladığı ve patogenezele ilgisi olduğu düşünülen enzimler iki ana grupta toplanmaktadır;²⁰

2. 6. 5. a. Proteinazlar: *C. albicans* ve başka bazı *Candida* türleri tek nitrojen kaynağı olarak protein içeren besiyerlerinde geliştiklerinde proteinaz salgırlar. Proteolitik enzimlerin önemli bir patojenlik belirtgeni olduğuna dair deliller bulunmaktadır. Bunlar, başta *C. albicans*, sonra daha az derecede *C. tropicalis*, orta derecede *C. parapsilosis* kökenleri olmak üzere yalnızca en patojen *Candida* türleri tarafından salgılanmaktadır. Yüksek proteolitik etkinliğe sahip *C. albicans*

kökenlerinin in vivo proteinaz salgılayarak farelerde daha yüksek oranda ölüm ve kolonileşmeye sebep oldukları gösterilmiştir.²⁰

Kandidozda patogenezin başlangıç aşamalarında antijen özelliğinde bir asit proteinaz varlığı belirlenmiştir.²⁰

Hücre dışı salgısal asit proteinazı 1993'de American Society for Microbiology tarafından salgısal aspartik proteinazı adı ile kabul edilmiş ve *C. albicans*'ın aspartik proteinaz ailesini kodlayan birçok gen (SAP) kodlanmış; SAP gen ifadenmesinin bu mantarın mayadan hif forma geçişi (dimorfizmi) ve fenotip değişimi ile ilgili olduğu ortaya konmuştur. SAP1, SAP2, SAP3 genlerinin yalnızca maya hücrelerinde, SAP4, SAP5, SAP6'nın ise hif hücrelerinde; SAP1'in *C. albicans*'ın opak fenotipinde, SAP2 ve SAP3'ün ise hem opak hem de beyaz fenotipte ifade edildiği belirtilmiştir.²⁰

Proteinazların *Candida*'ların patojenliğine katıldığı izlenimi edinilmekteyse de hem mayayla hem de konakla ilgili diğer faktörler de göz önüne alınmalıdır; aslında belirli bir kökende proteinaz üretme yeteneğinin bulunması virülansı garanti etmemektedir.²⁰

2. 6. 5. b. Fosfolipazlar ve lizofosfolipazlar: *C. albicans* yumurta sarısı ve lesitin içeren besiyerinde üretildiğinde fosfolipaz etkinliğinin ürünleri olan gliserilfosfokolin, fosfokolin ve lizolesitin oluşturmaktadır. Mantarlarda bulunan fosfolipazların A, B ve C tipinde olduğu, D tipinin varlığına ilişkin bir delil olduğu bildirilmemiştir.²⁰

C. albicans'ın ürettiği fosfolipazın iki önemi vardır, bir taraftan mayanın gelişmesinin kontrolü ve parazit hücre zarının biçimlendirilmesi, diğer yandan kandidoz lezyonlarında konak dokusuna yayılma ile ilgilidir.

İkinci olarak bahsedilen özelliğin birinciden daha önemli olduğu, ileri çalışmalar yapılmasının gerekliliği vurgulanmaktadır.²⁰

2. 6. 6. Biyofilm (Slime) faktörü

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri organik bir ekzopolisakkarid matriks içine gömülü ve hareketsiz olarak birbirine, bir katı yüzeye veya bir ara yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş halde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur.^{24, 25}

Bu biyofilm özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda ve damar içi kateter veya protezi olan hastalarda infeksiyonlara yol açabilmektedir.^{20, 25, 26}

C. albicans bileşiminde karbonhidrat (%41), protein (%5), fosfor ve heksozamin ihtiva eden bir ekstraselüler matriks sentezleyerek hücre dışında biriktirir.¹⁰ Bu yabancı cisim organizmada fibronektin, fibrinojen, vitronektin veya laminin ile kaplanır ve mikroorganizmalar konağın bu matriks proteinlerine yapışabilirler.²⁰ Bu matriks hidrofobiktir ve konak doku proteinlerine tutunabilir.¹⁰

Kateterde ortaya çıkan biyofilmlerde hem mikroorganizmaya hem de konağa ait faktörler rol oynamaktadır. Bu yapışma ve kolonizasyon için mantarın biyofilm faktörü, konağın da fibrin ve fibronektinleri gereklidir.^{20, 23}

Kateterler, ekstraselüler matriks içinde biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ile kolonize olmakta ve mikroorganizmanın bu biyofilmden ayrılması çoğu kez septisemi ile sonuçlanmaktadır. Hastane

kaynaklı kan dolaşımı ile ilgili infeksiyonların başında Gram negatif bakterilerden sonra mantarlar gelmektedirler. Fungeminin en yaygın etkeni olan *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. glabrata* gibi *Candida* türlerinin biyofilm yapımı da virülansta etkili olmaktadır. Ancak proteolitik enzimler, fosfolipaz, dimorfizm gibi diğer virülans faktörlerinden daha az öneme sahip olabileceği de düşünülmektedir. Bu yorum, biyofilm faktörünün virülans etkisinin diğer etmenlerde olduğu gibi tüm vücut bölgeleri için genel anlamda geçerli olmayıp yalnızca kateter gibi yabancı bir cisme bağlı infeksiyonlarla sınırlı bir çerçevede kalmasından kaynaklanıyor olabilir. Ancak; geçtiğimiz on yıl içerisinde hızla öne çıkmış olan ve immün yetmezliği bulunan kişilerde görülen, çoğu ölümlerle sonuçlanan fırsatçı mantarların sebep olduğu infeksiyonlara ek olarak; son günlerde bu virülans faktörlerine bağlı olarak immün sistemi sağlam olan konaklarda da yaşamı tehdit eden fırsatçı mikozlardan söz edilmeye başlanmıştır.²⁰

2. 6. 7. Fenotip değişimi

C. albicans'ın düzgün yüzeyli, beyaz renkli koloniler oluşturan yuvarlak-oval, tomurcuklu “beyaz” faz hücreleri; geniş yüzeyli, yassı, yüzeyi pürüklü, gri renkli koloniler oluşturan uzun, büyük “opak” faz hücrelerine dönüşür (W-O değişimi). Bu değişimin, mayanın konak epitel hücrelerine tutunmasında ve nötrofil aktivasyonunun bozulmasında etkili olduğu ve opak koloni oluşturan suşların virulansının daha düşük olduğu bildirilmiştir.^{14, 20, 27, 28, 29, 31}

Beyaz fenotipte düzgün yüzeyli (S) beyaz renkli koloniler ve yuvarlak tomurcuklu hücreler oluşmaktadır. *C. albicans* kökenlerinin çoğu beyaz fenotiptedir. Opak fenotipte geniş yüzeyli, yassı, yüzeyi pürüklü gri (R) koloniler ve uzun büyük hücreler görülmektedir. Her iki fenotipin

hücrelerinin DNA içeriği aynı kalmaktadır. Opak tipin hücreleri beyaz tipin üç katı hacimdedir. Beyaz fenotipten opak fenotipe geçiş daha yüksek, opaktan beyaza değişim ise daha düşük orandadır.³¹ Bu sistemin *C. albicans*' in patogeneğinde virölans faktörü olarak mantarın konağın savunma sistemine karşı koyabilmesinde ve ilaçlara duyarlılığının değişebilmesinde rol oynadığı öne sürülmektedir.²⁰

2. 7. Kandidozda Patogenez

Candida cinsi mantarlar cilt, gastrointestinal ve genitoüriner sistem florasının bir üyesidir ve hatta solunum sisteminde de bulunabilir. Gastrointestinal kanalda geçici veya sürekli bulunma oranı %40-50 arasında saptanmıştır.³²

Candida infeksiyonlarını hematojen ve hematojen olmayanlar olarak iki ana grupta ele almak da mümkündür.³²

Patojenite, bir organizmanın hastalık oluşturma yeteneği olarak belirlenir. Mikroorganizmaların hastalık oluşturma özellikleri ise, esasen aralarında kesin bir sınır olmayan iki terimle açıklanır; hastalık yapıcı karakterdeki "patojen" mikroorganizmalar ve hastalık oluşturma özelliği bulunmayan "apatojen" olanlar. Hastalık yapıcı karakterdeki bir mantarın vücuda girmesi infeksiyonun oluşmasındaki ilk aşamadır ancak infeksiyonun meydana gelmesi için yeterli değildir. Konakta üreyebilme ve çoğalma özelliği etkenin infeksiyon oluşturunabilmesi için bir ön koşuldur. Eğer etken vücuda yerleşmiyor, üremiyor veya yayılma eğilimi göstermiyor ise infeksiyon oluşmaz. Bu sebeple vücutta patojen bir mantarın bulunması infeksiyonun başlaması için ön koşul olmasına rağmen infeksiyonun gelişmesinde yeterli değildir. Mantarla konak arasındaki karşılıklı etkileşim sonucuna bağlı olarak ya subklinik düzeydeki

infeksiyonlar (latent veya gizli infeksiyonlar) ve/ veya klinik bulguların (görülebilir belirtiler)in ortaya çıkması şeklinde hastalık meydana gelir veya meydana gelmesi önlenir. Etkenin hastalık yapıcı birçok özelliği ile konağın duyarlılığı tarafından belirlenen bu olay özellikle insanlarda sıradan bir kommensal olarak bulunan fakat konağın savunması zedelendiğinde dokulara yayılarak ona zarar verebilen *Candida*'ların yaptıkları infeksiyonların altındaki gerçeği oluşturur.²⁰

Candida' lar fırsatçı patojendir ve *Candida* hastalarında ortak bulgu immün sistemdeki bir defektin önceden mevcut olmasıdır. Bilhassa T hücrelerinin fonksiyon dışı kalmaları *Candida* infeksiyonları için davet edici bir niteliktedir.¹⁰

Lokal veya genel immün yetmezliğin ortaya çıkması yaş, aşırı kilo veya kaşeksi, şeker hastalığı, dejeneratif hastalıklar, uzun süren infeksiyonlar, uykusuzluk, kötü beslenme, kortizol kullanılması, kanser, avitaminoz, metabolik hastalıklar gibi endojen sebeplerle olabileceği gibi, fiziksel veya kimyasal travma, radyasyona maruz kalma, aşırı stres gibi ekzojen sebeplerle de olabilir.¹⁰

İmmün sistemi tamamen veya kısmen fonksiyon dışı bırakan faktörler sistemik veya lokal olabilir. Örneğin kalp, göz, diş protezi gibi veya kateter gibi uzun süre suni materyal temas eden dokularda lokal bir immün yetmezlik durumu görülebilir. Veya sigara, alkol gibi tahriş edici kimyasallar ile temas eden mukoza ve deride lokal olarak immün savunma hasar görebilir. Dolayısıyla immün savunmanın azaldığı herhangi bir dokuda *Candida* infeksiyonu görülmesi şaşırtıcı bir durum değildir.¹⁰

Candida' lar, aynı florada bulunan bakteriler ile belirli bir antagonizma içerisinde yaşarlar. Bakteri sayı ve çeşitliliğindeki bir azalma

Candida' ların florada baskın duruma geçmesine sebep olabilir. Buna “bakteriyel diskordans” denir. Uzun süre antibiyotik kullanılması bakteriyel diskordansa sebep olabilir ve *Candida* infeksiyonunu başlatabilir.¹⁰

Candida infeksiyonları primer olarak kutanöz, mukokutanöz (yüzeyel) ve sistemik (dissemine) olmak üzere 3 gruba ayrılır. Yüzeyel kandidozlar deri ve mukozaların, derin kandidozlar ise iç organ ve sistemlerin infeksiyonlarıdır. Yüzeyel kandidozda; *Candida*, deri veya mukozadaki bir açıklıktan doku içine yabancı hücreleri sayesinde girer, yabancı hücrelerden meydana gelen blastokonidyumlar ile dokuya yayılım gerçekleştirilir.^{2, 14} Derin kandidozlarda; genelde sindirim sistemindeki mevcut kolonizasyon, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda kan yolu ile yayılarak böbrek, deri, göz, kalp, akciğer, dalak gibi organlar başta olmak üzere çeşitli organ ve sistemlere yerleşim söz konusudur.¹

2. 8. Kandidozda Bağışıklık

Yabancı bir ajanın organizmaya girişini önlemede ilk savunma mekanizması deri, mukus, silialı epitel, mide asidi ve safra gibi doğal bariyerlerdir. Eğer bu bariyerler bozulur veya ajan başka bir yolla vücuda girerse ateş, interferon, kompleman, doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri), nötrofiller, makrofajlar gibi hızlı lokal yanıtı oluşturan, antijene spesifik olmayan doğal bağışık yanıt devreye girer. Doğal bağışıklığın yetersiz kaldığı durumlarda ise, antikor ve T hücrelerinin oluşturduğu kazanılmış bağışık yanıt oluşur. *Candida* infeksiyonlarına karşı gelişen bağışıklık, doğal ve kazanılmış bağışıklık arasındaki karmaşık bir ilişki sonucunda gerçekleşmektedir.^{5, 14, 19, 27, 33, 34}

İmmün sistemi bozulmuş hastaların sayılarındaki artış ile birlikte mantarlar insanlarda oluşan infeksiyon hastalıklarının önde gelen nedenlerinden biri olmaya başlamışlardır.³⁵ *C. albicans* veya diğer *Candida* türleri tarafından oluşan infeksiyon kandidozdur. Yüzeyel ve sistemik kandidozun en sık nedeni *C. albicans* olup, tüm mantar infeksiyonlarının % 88-95'ini oluşturur.³⁶

Kandidoz mukokutanöz ve sistemik (dissemine) olarak iki ana klinik formda görülür.³⁵

Sistemik kandidoza karşı ana koruyucu mekanizma doğal immünitedir. Doğal immünite, fungal yükü kontrol ederek, sitokin yapımı ve ko-stimülatör moleküllerin ifadelenmesinin regülasyonu ile spesifik immünitenin gelişimini kontrol eder. Fagositler büyük hifleri ve psödohifleri fagosit edemedikleri için bunlara karşı ekstraselüler öldürme mekanizmalarını kullanırlar. Oksijen-bağımlı ve oksijen-bağımsız mikrobisidal mekanizmalar ve fungisidal aktiviteye sahip olan lizozomal katyonik proteinlerin ekstraselüler çevreye salınması fagositlerin kullandıkları başlıca mekanizmalardır.³⁵

Mukokutanöz kandidoz hücresel immün sisteminde defekt olan kişilerde görülür.³⁵

Fungal infeksiyona karşı savunmada kullanılan doğal, hücresel ve humoral immün mekanizmalarının şekillenmesi fungusun bir takım özelliklerinin yanı sıra konağın özellikleri ve infeksiyonun olduğu anatomik bölgeyle de ilişkilidir. Funguslara karşı immün yanıtta, konağın immün sistemi ile fungusların geliştirdiği bir takım immün sistemden kaçış mekanizmaları arasında kıyasıya bir mücadele söz konusudur.³⁵

2. 8. 1. Doğal bağışıklık

C. albicans'a karşı primer kazanılmış bağışıklığın T helper 1 (Th1) yönünde gelişmesinde profesyonel makrofajlar, profesyonel olmayan epitelyal hücreler ve nötrofillerin yer aldığı doğal bağışıklık sistemi hücreleri çeşitli düzeylerde düzenleyici rol alırlar.³⁷

a) Nötrofillerin rolü: Nötrofillerin, makrofajlardan daha fazla IL- 10, IL-12 gibi yönlendirici sitokinleri sağladıkları saptanmıştır. İnsan nötrofilleri, *C. albicans*'ın mannoproteinine karşı IL-12 üreterek, periferik kan mononükleer hücrelerinden Th1'e yönelik sitokinlerin üretimini teşvik ederler. Nötrofiller fagositozun hemen ardından *Candida* antijenlerinin salınımına ve sinyal iletimi ile kostimülator moleküllerin ifadenmesine yol açmaktadır.³⁷

b) Dendritik hücrelerin (DH) rolü: Dendritik hücrelerinin Th yanıtının başlatılmasında ve Th eğitiminde önemli rolü vardır. Dendritik hücrelerin mantarla ilişkisine bağlı olarak *Candida*' lar ya deri ve mukozada kommensal olarak kalmakta ya da patojen olarak davranmaktadır. Bu hücreler, bir dönem fagositoz yaparlar ve mayaların hücre içine alınmasını takiben fagolizozom oluşarak maya hücrelerinin parçalanması süreci başlatılır; hiflerin içeri alınması ise konvansiyonel fermuar-tipinde gerçekleşir; hifler fagolizozom membranının yırtılmasını takiben sitoplazmaya kaçarlar. Mayaların yutulmasını takiben DH'lerde IL-12 ve nitrik oksit (NO) üretimi etkinleşir; hifler böyle bir etki yaratmaz. Yani DH'ler *C. albicans*'ın iki formuna karşı oluşturulacak bağışık yanıtı ayırt etme ve Th yanıtlarını etkinleştirme yeteneğine sahiptirler.³⁷

c) Epitelyal–endotelyal hücreler: Çeşitli sitokin ve kemokinler üretirler. Özellikle mukozal yüzeylerde *Candida'* ların çoğalmasını önlerler.³⁷

Endotel hücrelerde *Candida'* lara karşı fagositik etkinlik saptanmıştır. Ancak, bu durum mayaların endotellerde hasar oluşturmaya yol açmakta ve hematojen infeksiyonlara neden olmaktadır. Gama interferonun (IFN- γ) varlığında, mayaların endotellere aderensinin arttığı fakat aktin polimerizasyonunun bozulmasına bağlı olarak fagositozlarının engellendiği saptanmıştır.³⁷

d) Diğer hücreler: Makrofajların da CD4 Th1 yanıtı üzerinden doğal bağışıklıkta rolü olabileceği bildirilmiştir.³⁷

2. 8. 2. Kazanılmış Bağışıklık

Candida türleri hücrel ve humoral bağışıklık sistemlerinin ikisini de aktive etmektedir. Antikor aracılı humoral bağışıklık, sistemik kandidozda hücrel bağışıklık kadar önemli rol oynamamaktadır. Humoral bağışıklık özellikle opsonizasyon yolu ile *Candida* hücrelerinin makrofajlar tarafından daha kolay yutulmasını sağlar. Bunun dışında antikor aracılı bağışıklık sisteminin ve bu sistem faktörlerinin kandidozdaki rolü tartışmalıdır.^{14, 27, 34, 38, 39}

Candida infeksiyonlarında koruyucu özellikte olan hücrel bağışıklık, T lenfositleri kontrolünde hareket eden makrofajlar, nötrofiller ve NK hücrelerinden oluşmaktadır. *C. albicans* blastokonidyasının mononükleer fagositik hücreler ve makrofajlar tarafından hücre içinde öldürülmesinin ilk basamağı fagositozudur. Mannan, glukan ve diğer hücre yapıları makrofajları uyarır. Araşidonik asit, IL-1 β , IL-6, TNF- α

makrofajlardan salınır. TNF- α , makrofajların mikrobisidal aktivitesini düzenlediği gibi, nötrofillerin *C. albicans* hiflerini öldürmesini de artırır.^{40, 41,}

42

C. albicans'ın kompleman aktivasyonunda kullandığı temel mekanizma alternatif yoldur. Kompleman yolunda C5 bileşiği erken dönemde mayaların eliminasyonunda önemlidir.⁴³

NK hücrelerinin *C. albicans* ile karşılaştırılması sonucunda sitotoksik aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. NK hücrelerinin *Candida*'lara karşı doğal hücrel sitotoksik etkilerinin bulunduğu bildirilmiştir.^{2, 44}

Polimorfonükleer (PMN) lökositlerin de kandidoz patogeneğinde önemli olduğu anlaşılmıştır. PMN hücreleri myeloperoksidaz gibi enzim ve defensinleri ile *Candida* türlerinin fagositozundan sorumludur.^{5, 20, 30} PMN lökositler, sitokin reseptörleri içermektedir ve bu hücrelerin uygun sitokinlerle uyarılması mantarların yok edilmesini arttırıcı etki oluşturabilir. IL-4 ve IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin nötrofillerin kandidisidal aktivitesini bozduğu belirtilmiştir.^{11, 12, 40}

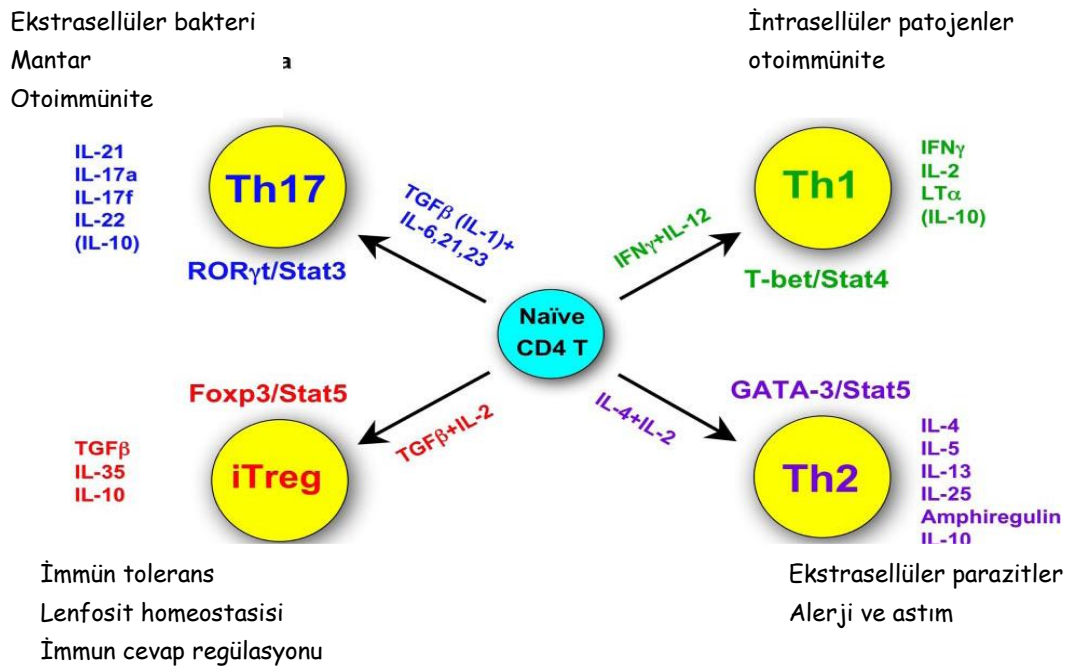
Mononükleer hücreler fungal patojenlere karşı koruyucu yanıtta önemli rol oynar. Monosit ve makrofajların yüzeylerinde IgG1 ve IgG3 Fc parçası, C3b ve çeşitli lenfokinlere ait reseptörler ve diğer molekülleri bağlayan reseptörler bulunmaktadır. Böylece mikroorganizmaların fagositoz işlemi kolayca gerçekleştirilir.³³

Tüm mikroorganizmalarda olduğu gibi, mantarlar da, antijen sunucu hücreler tarafından işlendikten sonra T lenfositlerine sunulur. Fungal antijenler lizozomun asidik veziküllerinde peptid parçalarına ayrılır. Bunlar HLA sınıf 2 antijenlerine bağlanarak, HLA-peptid kompleksi

şeklinde hücre yüzeyine sunulur ve spesifik CD4⁺ Th lenfositleri tarafından tanınır.³⁰

Th lenfositleri bağışıklık sistemi ana hücreleridir. B hücrelerinin ve sitotoksik T lenfositlerinin aktivitelerini artırır. Ayrıca salgıladıkları çeşitli lenfokinler aracılığı ile monositlerin, makrofajların ve diğer bazı hücrelerin sayıca ve etkinlikçe güçlenmelerini sağlar.¹¹

Aktive olan CD4⁺ T lenfositleri çoğalır ve olgun Th₀ lenfosit halini almaktadırlar. Bu hücreler, gelecek bağışık yanıtı göre IL-2 ve IFN- γ salgılayan Th1 hücrelerine, IL-4, IL-5 salgılayan Th2 hücrelerine, IL-10 salgılayan iTreg hücrelerine ve IL-17 salgılayan Th17 hücrelerine farklılaşmaktadırlar. Th₀ hücreleri IL-12 varlığında Th1, IL-4 varlığında Th2, TGF- β ve IL-2 varlığında iTreg, TGF- β ve IL-6 varlığında ise Th17' ye dönüşmektedirler.^{11, 12, 45, 46, 47}



Şekil 2.1: Naif CD4⁺ T Hücre Farklılaşması

2. 9. 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 ağırlığında bir grup potent peptid veya glikoprotein yapısındaki solübl madde “sitokin” olarak adlandırılır.^{33, 48, 49}

Sitokinler, doğal ve kazanılmış bağışık yanıtta rol alan, bağışık ve inflamatuvar olaylara katılan hücrelerin etkinliklerinin arttırılmasını sağlayan proteinlerdir. Hücreler arasında mesaj ileten biyolojik yanıt değıştiricilerdir.⁴

Sitokinler, lenfoid hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlar. Bağışık yanıtı düzenler. İnflamasyona katılan hücreleri aktive eder; bu hücreleri reaksiyon yerine toplayarak orada tutar; çeşitli biyolojik etkinlikler gösterir. Bazı hipofiz hormonlarının sentez ve salınımına neden olur. Ateş ve akut faz cevabını oluşturur. Bazıları antiviral etkinlik gösterir. Baş ağrısı, miyalji, ateş gibi genel infeksiyon belirtilerinin oluşumunda, yüksek dozlarda şok, toksik, hatta öldürücü etki oluşumunda rol oynarlar.⁴⁸

Sitokinlerin Genel Özellikleri;

1) Sitokinler doğal ve kazanılmış immün yanıtın efektör fazında üretilirler ve bağışıklık ve inflamatuvar yanıtların oluşmasını ve düzenlenmesini sağlarlar. Doğal bağışıklıkta lipopolisakkarid gibi mikrobik ürünler mononükleer fagositleri direkt olarak uyararak kendi sitokinlerini salgılatırlar. T hücrelerinden salgılanan sitokinler yabancı antijenlerin özel olarak tanınması sonucu meydana gelirler.⁴⁸

2) Sitokin salınımı kısa, kendini sınırlayan bir olaydır. Genel olarak sitokinler öncül moleküller olarak depolanmazlar ve sentezleri yeni gen transkripsiyonu ile başlatılır. Bu transkripsiyonel aktivasyon genellikle geçici olup, sitokinleri kodlayan mRNA'lar stabil değildir. Bu nedenle sitokin salınımı geçicidir ve bir kez sentezlendiğinde, sitokinler hızla salınırlar.⁴⁸

3) Sitokinler birçok farklı hücre tiplerine etki ederler. Bu özelliğe *pleiotropizm* denir.⁴⁸

4) Sitokinlerin aynı hedef hücrede farklı birçok etkileri vardır. Bazı etkiler aynı anda meydana gelirken, bazı etkiler farklı zaman aralıklarıyla oluşabilir (dakikalar, saatler, günler).⁴⁸

5) Sitokin etkinliği genellikle gerektiğinden fazladır.⁴⁸

7) Sitokinler genellikle diğer sitokinlerin fonksiyonlarını etkilerler. Kendi aralarında agonist ve antagonist etkileşimler gösterebilirler.^{14, 33, 48}

8) Sitokinler, diğer polipeptid hormonlarda olduğu gibi hedef hücrenin yüzeyindeki özel membran reseptörlerine bağlanarak etkilerini başlatırlar. Bu reseptörler transmembran proteinler olup, ekstraselüler domainleri vardır ve özel olarak sitokinleri ve büyüme faktörlerini tanır ve bağlarlar.⁴⁸

9) Birçok sitokin reseptörünün ekspresyonu özel sinyaller tarafından üretilir.⁴⁸

10) Sitokinlere verilen hücresel yanıtların çoğu yeni mRNA ve protein sentezini gerektirmektedir.⁴⁸

11) Birçok hedef hücre için sitokinler hücre bölünmesini düzenlerler yani büyüme faktörü gibi etki ederler.⁴⁸

Th1 yanıtı, genellikle enfeksiyonun erken evresinde lokal bir yanıt olarak meydana gelir; inflamatuvar sitokinlerden IFN- γ , IL-2, IL-12'nin üretimlerinin artışı ve antifungal efektör hücrelerin makrofaj ve PMN lökositlerin uyarılması ile birliktelik gösterir. 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 kandidisidal etkilerini arttırdığı düşünülmektedir. Viral enfeksiyonlara ve hücre içi patojenlere karşı savunmayı oluşturmaktadırlar. Bu hücreler hücresel bağışık yanıtın oluşmasında etkin rol oynamaktadırlar.^{11, 12, 14, 27, 30, 38, 50}

Th2 yanıtı, lenf nodlarında antijenin B lenfositleri, dendritik hücreler veya makrofajlarla sunulması sonucu genellikle geç gelişen 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.^{33, 34, 40} Th2 yanıtının yüksek olması, konakçının ilerleyici tarzda enfeksiyona 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 hücresel aşırı duyarlılığı inhibe eder.^{30, 40, 50}

2. 9. 1. İnterlökin 17 (IL-17)

CD4⁺ Th hücreleri değişik sitokinleri üreterek farklı fonksiyonlara neden olan efektör hücre alt gruplarına farklılaşmaktadır. Stockinger ve arkadaşları, 2006 yılında naif CD4⁺ T hücrelerinin ortamda TGFβ (IL-1) , IL-6, IL-21 ve IL-23 varlığında Th17 hücrelerine dönüştüklerini göstermişlerdir.^{45, 46, 47}

Transkripsiyon faktörleri NFAT (T hücre nükleer faktörü) ailesini kapsamaktadır. Th17 farklılaşmasında RORγt (transkripsiyon faktörü) çok önemlidir. RORγt, IL-17' yi indüklemektedir. Oysaki RORγt bakımından defekt hücrelerde IL-17 çok az üretilmektedir. RORα (transkripsiyon faktörü) ise Th17 hücrelerinde yüksek regülasyona sahiptir. Bununla birlikte RORα delesyonu, IL-17 ürünüde minimal etki oluşturmaktadır. RORγ ve RORα' nın ikisi de defekt olduğu zaman IL-17 ürünü tamamen ortadan kalkmaktadır. Stat3 (sinyal iletici ve transkripsiyon aktive edici faktör) ise IL-6, IL-21 ve IL-23 için temel sinyal ileticidir. IL-17 ürünü içinse zorunludur. Aynı zamanda IL-23R' nin uyarılmasından sorumludur. İnterferon regülatör faktör 4 (IRF4) 'ün, Th17 farklılaşması için kritik olduğu son zamanlarda rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, IRF4^{-/-} T hücreleri IL-17 üretmeyi hiç başaramamışlardır.^{45, 51, 52, 53, 57, 58, 59, 60}

Th17 farklılaşması 3 aşamadan oluşmaktadır;

Farklılaşma aşaması:	TGF-β ve IL-6' ya dayanır.
Amplifikasyon aşaması:	IL-21 aracılığıyla olur.
Stabilizasyon aşaması:	IL-23 ile oluşur.

Th17 hücreleri IL-23R'yi yüksek seviyelerde, IL-1R1'i ve IL-18Rα'ı yeterli miktarda ifade etmektedirler. IL-1R1, IL-17 ürünü için kritik

görünürken, Th17 hücrelerinde IL-18R α 'nın fonksiyonu karışıktır. İnsan Th17 hücreleri, kemokin reseptörleri arasından CCR6 ve CCR4'ü koeksprese etmektedirler.⁴⁵

Genel olarak Th17 hücreleri ekstraselüler mantar ve bakterilere karşı immün cevaplarda rol oynamaktadırlar. Nötrofilleri aktive eder ve düzenlerler. İnflamatuvar sitokinleri uyarmaktadırlar. Akantozu ve dermal inflamasyonu uyarmada rol oynamaktadırlar. Akut karaciğer inflamasyonu boyunca hepatositleri korumaktadır.⁴⁵

Th17 hücrelerinin ana sitokini olan IL-17 proinflamatuvar bir sitokindir. IL-17' nin en önemli rolü otoimmün hastalıkların patogeneğinde yer almaktır. Ayrıca, çeşitli infeksiyonlara karşı koruyucu immüniteyle ilgilidir. *C. albicans* gibi fungal patojenlere ve *Klebsiella pneumoniae* gibi ekstraselüler bakterilere karşı nötrofil bağımlı koruyucu immün cevabı aktive etmektedirler. IL-17' in intraselüler patojenlere karşı korumadaki rolünün önemi de rapor edilmiştir. Bu patojenler içinde *Mycobacterium* da bulunmaktadır. İlginç olarak sadece CD4⁺ T hücreleri değil, TCR yđ eksprese eden CD4⁻ CD8⁻ T hücrelerinin de IL-17 ürettiğı belirtilmiştir. IL-17 üreten hücreler hem doğal hem de kazanılmış bağışıklığa katılmaktadırlar.^{45, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60}

IL-21, Th17 farklılaşması için uyarıcı bir faktördür ve pozitif feedback amplifikatör olarak rol oynamaktadır. IL-21 aynı zamanda CD8 T, B, NK ve dendritik hücrelerinde rol oynamaktadır. IL-22 ise akut karaciğer inflamasyonu boyunca hepatositleri korumaktadır. *K. pneumoniae* ve *Citrobacter rodentium* gibi bakteriyel patojenlere karşı konak savunmasına aracılık etmektedirler.^{45, 51, 52, 53, 57, 58, 59}

2. 10. Kandidozda Tanı

Mikoloji laboratuvarında klinik örneklerle ilk olarak uygulanması gereken işlemler: ⁶¹

1) Işık mikroskopisi çok basit bir incelemedir. Temiz bir lam üzerine bir damla fizyolojik tuzlu su damlatılır, örnek bu damla ile karıştırılıp bir süspansiyon elde edilir. Üzerine temiz bir lamel kapatılıp 300-400 büyültme ile ışık mikroskopunda incelenir. *Candida* maya hücreleri ve psödohiflerin görülmesi tanı için önem taşır. Kesin tanı koydurucu değildir. Boyalı preparatlar ve kültür yöntemleri de yapılmalıdır.

2) Örnek üzerine % 10-15 KOH + % 1 kalkoflor beyazı konarak hazırlanan preparasyon floresans mikroskopta incelenir ve mantar elemanları (hif ve/veya spor) aranır. ^{61, 62}

3) Gram boyası(fungal elementler gram-pozitif boyanırlar) ⁶¹,

4) Çini mürekkebi boyası ⁶¹

5) Germ tüp testi, 90 dakika içinde, *C.albicans*'ı, hifal element oluşumunu gösterme yoluyla, *albicans* olmayanlardan ayırmaya yarayan testtir. Blastokonidya (tomurcuklanmış mantar), hifa ve psödohifanın gösterilmesi, doku invazyonunu kuvvetle destekler ancak tanısal değildir. ⁶²

Doku incelenmesinde hematoksilen eozin (HE), periyodik asit-schiff (PAS) ve Gomori'nin metenamin gümüş boyası (MGB) tanıda yararlıdır. Derin dokuların biyopsi örneklerinde *Candida* organizmalarının görülmesi kandidozun kesin tanısını sağlar. ⁶²

Mikoloji laboratuvarında preparasyonların mikroskopik incelenmesi sona erdiğinde kültürel işlemlere geçilir. Ekim yapılan besiyerleri 26 ve 37°C'de inkübe edilir. Bir-dört hafta içinde veya sonunda üreme görülmüşse koloniden preparat hazırlanır. İzole edilen mantar bir maya ise; bu mayanın hif ve/veya yalancı hif oluşturup oluşturmadığı, klamidospor varlığı, karbonhidrat asimilasyonu, nitrat asimilasyonu, şeker fermentasyonu ve gerektiğinde diğer özellikleri araştırılarak tür düzeyinde tanıya gidilir.⁶²

SDA gibi rutin besiyerlerinde, oda sıcaklığında ve 37°C'da 24 saatte üreyip genellikle kirli-beyaz veya krem rengi, yumuşak kıvamlı ve tipik olarak mayamsı, kokulu koloniler yaparlar. Koloninin besiyeri yüzeyinde kalan bölümü blastokonidyumlardan oluşmuştur; besiyeri yüzeyinin altında ise yalancı hifler bulunur. Tween 80 agarda, 25°C'da 72 saatte, psödohif, (bazen gerçek hif), septalarında yuvarlak blastokonidyalar ve geniş, kalın-duvarlı terminal klamidosporlar oluşturur.⁶²

Mantar infeksiyonlarının erken tanısına yönelik çalışmalar hızlanmıştır. Direkt tanı, kültür içeren rutin tanımlama yöntemleri altın standartlığını korumaktadır.³¹ Ancak kültür yöntemlerinin zaman alıcı olması, infeksiyon bölgesinden örnek alınamaması, alınan örneklerde kültür pozitifliğinin sınırlı sayıda olmasından dolayı tanıya yeni yöntem arayışı devam etmektedir.^{31, 63}

Özellikle invaziv fungal infeksiyondan şüphelenilen tüm vakalardan mutlaka kan kültürü alınmalıdır. Kan kültür pozitifliğini arttırmak ve *Candida* türlerinin saptanmasına kadar geçen süreyi kısaltmak için çeşitli yöntemler araştırılmıştır. *Candida* türlerinin anaerobik koşullarda iyi ürememesi nedeniyle, kan kültür şişelerinin havalandırılması, en az 20 ml kanın aerobik kültürünün yapılması ve birden fazla kan örneği alınması ile

verimin artacağı düşünölmüştür. Bifazik medya kullanımı ve son yıllarda geliştirilen lizis sentrifügasyon yöntemi ile kandideminin daha çabuk ve daha yüksek bir duyarlılıkta saptanabildiği bildirilmiştir.¹⁸ BACTEC ve BacT/Alert metotları, kan kültürlerinde mantarların tespitini hızlandırmıştır.^{31 62} Bu besiyerlerinde mayalar iki-üç günde izole edilir.³¹

Kromojenik besiyeri (CHROMagar *Candida*) *albicans* ve *albicans* dışı türleri birbirinden ayırır. Bu besiyerinde her türün belirli renk ve özellikte üremesine dayalı olarak tanımlama yapılır.^{62, 64, 65}

Candida türlerinin tanımlanmasında mikroskopik morfolojik özelliklerinin incelenmesi ve substrat asimilasyonunun değerlendirilmesine dayanan bazı metotlar kullanılır. 4-72 saat içinde sonuç veren, uygulaması daha kolay olan çeşitli ticari sistemler geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları biyokimyasal ve enzimatik reaksiyonları değerlendirebilen el ve/veya otomatize olarak kullanılabilen sistemlerdir. API ID 32C inkübasyondan 24-48 saat sonra, Rapid Yeast Plus (RYP) ise inkübasyondan 4-5 saat sonra sonuç verebilen sistemlerdir. API ID 32C sistemi çeşitli araştırmacılar tarafından standart tanı yöntemi olarak önerilmiştir.³¹

Var olan kültürel yöntemlerin zaman alışı, etken mantar izolasyonundaki başarı oranının çok yüksek olmayışı serolojik testlerin uygulanabilirliğini gündeme getirmiştir. Mantarlar, bakteriler ile karşılaştırıldıklarında zayıf antijenik yapıya sahip olsalar da, serumda sirküle olan antijen ve antikorlarının saptanması ve uygulanan deri testleri mikolojik tanıya yardımcı olmaktadır. Çeşitli mikotik infeksiyonlarda tedaviye yanıtın belirlenmesi için hastalık prognozunun izlenmesinde serolojik testlerden yararlanılabilir.⁶¹

Serumda veya vücut sıvılarında mantar antijenlerinin veya metabolitlerinin (ısıya duyarlı antijen, mannan, D-arabinitol ve enolaz) araştırılması, üzerinde en çok durulan serolojik testlerdir.^{62, 63}

Mannan, *Candida* hücre yüzeyinin, infeksiyon sırasında, dolaşıma geçen karbonhidratıdır. Dolaşımdan çabuk temizlenir ve kandaki düzeyi hızlı düşer. Bu nedenle saptanabilmesi için hastadan sık kan örneği alınması gerekir. Değişik çalışmalarda duyarlılık ve özgüllüğüne ilişkin farklı oranlar bildirilmektedir.⁶³

Enolaz, tüm *Candida* türlerince yapılır ve tespit edilebilir bir fungemi yokluğunda bile derin doku invazyonunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.⁶² Ardışık alınan kanlarda aranmasının duyarlılığı artıracağı kabul edilmektedir.⁶³

D-arabinitol bir fungal metabolittir ve serum D-arabinitol düzeyinin enzimatik florometrik yöntem veya kombine gaz kromatografi ve mass spektrometri ile saptanması, umut verici bir yöntemdir.⁶²

İnvaziv mikozlarda mortalitenin yüksekliğinden dolayı erken tanı çok önemli olduğu için ve bu yöntemlerle kısa zamanda sonuca ulaşıldığından günümüzde birçok araştırma laboratuvarında klinik örneklerde mantar DNA'sının saptanması konusunda ümit verici çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca, tür tayini, epidemiyolojik tiplendirme ve ilaç direnci konulu araştırmalarda da epeyce yol alınmış olup, çalışmalar sürdürülmektedir. İnfeksiyon etkeni mantarların saptanması ve tanımlanmasında nükleik asit amplifikasyon ve hibridizasyon problemlerinin kullanıldığı sinyal amplifikasyon yöntemlerinden yararlanılır.⁶¹ Nükleik asit amplifikasyon teknolojilerinde PZR veya benzeri yöntemler kullanılır.^{61, 62}

Son yıllarda çeşitli amaçlarla da kullanılan PZR yöntemi ile, birçok klinik örnekte mikroorganizmaya ait yapılar türe özgül olarak kısa sürede tespit edilebilmektedir.^{66, 67, 68}

2. 11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

İlk kez 1985’de bilim dünyasına sunulduğundan itibaren PZR; hem araştırmada hem de klinik laboratuvarlarda tanıda yeni bir çığır açmıştır. ABD’de Cetus Corporation’da çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilmiştir. Metot basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasıdır.¹⁹ Bu buluşundan dolayı K.Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya ödülüne hak kazanmıştır.

PZR reaksiyonu temel olarak çoğaltılması planlanan hedef bölgenin iki ucundaki DNA dizilerini özgül olarak tanıyıp karşı iplikçiklerini hibridize eden iki oligonükleotid primer, primerlere bağlanıp bunlara 3’ ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz, sentez için gerekli olan deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP; adenin (A), guanin (G), sitozin (C), timin (T)), polimerazın çalışması için gerekli olan tampon maddeler ve kofaktör olan Mg^{+2} iyonları kullanılarak bir DNA parçasının çoğaltılması esasına dayanmaktadır.¹⁹

PZR temel olarak 3 aşamalı bir yöntemdir. Bunlar;

1- Denatürasyon aşaması: Materyalden işleme alınan çift iplikli DNA yüksek ısı ($95-100^{\circ}C$) ile denatüre edilir. Yani, Hedef DNA ipliklerini birlikte tutan hidrojen bağları kırılır ve erir. Sonuçta; kendisine karşı cDNA oluşturacak iki ayrı tek DNA iplikçığı oluşur.³⁸

2- Bağlanma aşaması (annealing): İki kısa DNA primeri 30-60°C'de hedef DNA'nın karşıt ipliğindeki komplemanter sekanslara bağlanır. Bağlanma, hidrojen bağlarının yardımı ile olur. Bağlanma ısısı sadece DNA/DNA eşleşmesine olanak sağlayacak kadar yüksek ısıda olmalıdır.³⁸

3- Uzama aşaması (extansiyon=elongasyon): Ortama katılan büyük miktarlardaki deoksiribonükleozid trifosfatlar, yine ortama katılan Taq polimerazla primerler, 72°C'de, DNA kalıplarına bağlanarak yeni bir DNA çift zincir formuna uzarlar.³⁸

Sonra primerlerin uzama dönemleri tekrarlanır. İlk önce ısı artırılarak tüm çift iplikçikli DNA ' lar tek iplikçikli DNA'lara dönüştürölürler, daha sonra ısı azaltılarak bağlanma (tavlanma) ve uzama dönemlerine izin verilir. Reaksiyon ilerleme adımlarındayken, genelde 30 döneme kadar gider. Primerler ve deoksiribonükleozid trifosfat molekülleri progressif olarak tüketilir ve yeni DNA ipliklerinin sayısı artar.³⁸

Bu reaksiyonda primerler tüm yeni DNA ipliklerinin esasını oluşturdukları için; deoksiribonükleozid tri fosfatların yanı sıra iki farklı primerin her biri, başlangıçta hedef DNA'nın miktarına oranla fazla miktarda verilmelidir.³⁸

PZR' nin esas özelliği, önceden sentezlenen yapıların her birinin, birbirini takip eden dönemlerde yeni primer uzama reaksiyonlarında rol oynamasındandır. Yani, zincir reaksiyonu denilen bu reaksiyon, yeni DNA yapılarının geometrik olarak büyümesidir. Metodun başarı sırrı kısa ürünlerin miktarların da ki geometrik artmadadır.³⁸

2. 11. 1. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Revers Transcriptase Polymerase Chain Reaction= RT-PCR)

RNA molekülü PZR ile çoğaltılamadığından PZR aşamasından önce RNA, ters transkriptaz (reverse transcriptase) enzimi kullanılarak komplementer DNA (cDNA)'ya çevrilir. Ardından DNA, PZR ile çoğaltılmaktadır. Bu sentezler aşaması RT-PZR olarak adlandırılmaktadır.^{69, 70, 71, 72}

2. 11. 2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Son yıllarda PZR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocyclers) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, Gerçek zamanlı PZR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Gerçek zamanlı PZR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Gerçek zamanlı PZR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanılmaktadır.^{71, 73}

Gerçek zamanlı PZR Reaksiyon esnasında her bir PZR siklusunda yeterli miktarda ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışıp reaksiyon sonunda oluşan ürünü kontrol eden bir sistemdir.^{71, 72}

Gerçek zamanlı PZR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek

kalmamaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir.⁷¹

Klinik uygulamaları giderek artan Gerçek zamanlı PZR sistemleri, infeksiyon hastalıklarının tanısında, infeksiyon ajanlarının gen ürünlerinin ifadenmesinin tespitinde ve nokta mutasyonlarının belirlenmesinde sağladığı üstünlükler nedeniyle tercih edilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Gereçler

3. 1. 1. Cihazlar

LightCycler® 2.0 (Roche, Almanya)

Thermal Cycler (Apollo Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

Nanodrop cihazı (Thermo Scientific NanoDrop 1000, Spectrophotometer, ABD)

Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

Derin Dondurucu (Uğur, Türkiye)

Santrifüj cihazı (Li-32R, Boeco, Almanya)

Mikrosantrifüj (Beckman Coulter, Almanya)

Spin Santrifüj (Combi-Spin, FVL-2400N BioSan, Letonya)

Kuru blok (Bio TDB-100, Boeco, Almanya ve TDB-120, BioSan, Letonya)

Hassas terazi (Libror AEG-220, Japonya)

Otoklav (Sanyo, Japonya)

Sınıf 2 biyogüvenlik Kabini (Apollo Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

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

Mikropipetler ve uçları (Beta Pette™, ABD)

Makas, pens ve penset (Dizdarer, Ankara)

Cam eşyalar, bistüri, kapiller, enjektör

3. 1. 2. Kimyasallar

EZ-RNA Total RNA Isolation Kit (Biological Industries
Co. Israel)

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PZR
(Roche, Almanya)

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche,
Almanya)

Primerler (Eurogentec, Belçika)

Enjektabl Su (Drogsan, Türkiye)

EDTA (Fluka Biochemica, İsviçre)

Etil Alkol (%70'lik ve %75'lik) (Riedel-de Haen, Almanya)

5-Florourasil (200mg/kg) (Ebewa Pharma, Avusturya)

NaCl karışımı (% 0,9) (10^6 /ml maya içeren) (Sigma,
Almanya)

Teikoplanin (30mg/kg) (Targocid, Sanofi Aventis, Türkiye)

Siprofloksazin (660 mg/L) (Cipro, Biofarma, Türkiye)

Ketamin (100 mg/kg) (Richter Pharma, Avusturya)

Ksilazin (8 mg/kg) (Bioveta, Çek Cumhuriyeti)

Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (Fluka Biochemica, İsviçre)

Heliosis Ekstraksiyon Modülü (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

İzopropanol (Kimetsan, Türkiye)

Buz kalıpları

3. 1. 3. Diğerleri

Canlı gereçlerse şunlardır:

Wistar albino sıçan, 200-250 gr, dişi, (Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi)

C. albicans ATCC 10231 referans suşu

3. 2. Yöntemler

3. 2. 1. Suşlar

Çalışmada, *C. albicans* ATCC 10231 referans suşu kullanılmıştır.

3. 2. 2. Hayvan modeli

Deney hayvanı olarak, 200-250 gram ağırlığında, dişi, *W. albino* sıçanlar kullanılmıştır. Bütün hayvan deneyleri Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul onayı ile yapılmıştır. Her kafeste 4-5 tane sıçan olacak şekilde, 12/24-saat aydınlık/karanlık uygulanmış, oda ısısı

20-25 °C' de tutulmuştur. Deneklerin gıda ve suya kolay ve eşit ulaşımı sağlamıştır.

3. 2. 3. Nötropeni oluşturulması

5-Fluorourasil 200mg/kg dozunda deri altına verilerek oluşturulmuştur.

3. 2. 4. Kandidoz oluşturulması

Sekiz denek sağlıklı kontrol grubu olarak, 12 denek kandidoz grubu olan ayrılmıştır. Nötropenin beşinci gününde, sistemik kandidoz için, 10^6 /ml maya içeren %0,9 NaCl karışımı, kuyruk veninden uygulanmıştır. Bütün deneklere 30 mg/kg teikoplanin (5x1 IM) ve siprofloksazin 660 mg/L (içme suyundan) ile antibakteriyel profilaksi uygulanmıştır. Mikroorganizma inokülasyonunun beşinci günü, intramüsküler (IM) yoldan ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (8 mg/kg) anestezisi altında deney sonlandırılmıştır. Anestezi altında sıçanların abdomenleri % 70'lik etil alkol ile silindikten sonra steril makas ve penset yardımı ile açılmıştır. Kalpten kan alımı sırasında hayvanlar feda edilmiştir. Böbrekleri alınarak deneylerde kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Kontrol grubu olarak seçilen 8 sıçanın böbrek dokuları da aynı şekilde alınarak deneylerde kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

3. 2. 5. Dokuda İnfeksiyonun Gösterilmesi

Deneklerde infeksiyonun gösterilmesi için, hayvanlardan böbrek ve kan örnekleri alınmıştır. Mikrobiyolojik kültür için aseptik koşullarda ayrılan parçalar beyin-kalp infüzyon sıvı besiyerine alınarak mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Her dokudan 1 gramlık örnek 1 ml sıvı besiyerinde homojenize edildikten sonra her örnek aerob kültür içinde SDA' ya ekildi. Mikrobiyolojik inceleme 24-48 saat sonra yapıldı. Koloniler sayıldı ve üreyen koloniler fenotipik olarak isimlendirildi. Üreme miktarı koloni sayısı / 100 µl doku örneği olarak kaydedildi.

C. albicans ile infekte edilmiş örneklerden nükleik asit eldesi için Heliosis DNA izolasyon sistemi (Metis Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır. Elde edilen DNA'lar *C. albicans* için seçilen hedefleri çoğaltmak üzere Real Time PZR (LightCycler-Roche, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir. Dokuda DNA varlığının kontrolü için β -aktin geni 'housekeeping' gen olarak kullanılmıştır.

Tablo 3.1: Kullanılan Primer ve Prob Dizileri

Hedef	Primer veya Prob dizisi
β -actin (F)	5'-TGG AGA AGA GCT ATG AGC TGC CTG-3
β -actin (R)	5'-GTG CCA CCA GAC AGC ACT GTG TTG-3
Panfungal primer(18SrRNA geni)	5'-ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG (F) 5'-CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG (R)
<i>Candida</i> 640 florofofor prob	5'-TGG CGA ACC AGG ACT TTT ACT TTG
<i>Candida</i> floresan prob	5'-AGC CTT TCC TTC TGG GTA GCC ATT

3. 2. 6. Böbrek Dokusu Örneğinden Total RNA Eldesi

Doku örneklerinden RNA elde edilmesi için EZ-RNA Total RNA Isolation Kit (Biological Industries Co. Beit Haemek Ltd, İsrail) kullanılmıştır. Üretici firma önerilerine uygun olarak, 100 µl örnek ile çalışılmıştır. Kit içeriğinde bulunan DNaz ile örneklerdeki olası bulaşı engellenmiştir. Elde edilen total RNA miktarları RNA ölçüm cihazında (NanoDrop, ABD) ölçülerek RNA varlığı kontrol edilmiştir.

Testin uygulanışı;

- 1) Örnekler 0.5 ml denatürasyon solüsyonu içinde ezilmiştir.
- 2) Homojenatlar 5 dakika oda ısısında bekletilmiş ve ependorfa konulmuştur.
- 3) Üzerine 0.5 ml ekstraksiyon solüsyonu eklenmiş ve 15 saniye hafifçe çalkalanmıştır.
- 4) Oda ısısında 10 dakika bekletilmiş ve 15 dakika, 4°C ve 12000g' de santrifüj edilmiştir.
- 5) Yeni ependorfa üst fazı alınmıştır
- 6) Protokolün 3., 4. ve 5. basamakları tekrarlanmıştır.
- 7) Üzerine 0.5 ml izopropanol eklenip, karıştırılmış ve oda ısısında 10 dakika bekletilmiştir.
- 8) Sekiz dakika, 4°C ve 12000g' de santrifüj edilmiştir.
- 9) Örnekler -20°C' de 30 dakika bekletilmiştir.
- 10) Tek seferde süpernatantı hızlı bir şekilde dökülmüştür.
- 11) Pellet kısmı 1ml %75' lik alkol ile yıkanmıştır.
- 12) Beş dakika, 4°C' de ve 7500g' de santrifüj edilmiştir.

13) Pipetle süpernatant atılmıştır.

14) Pellet 5 dakika havada kurutulmuştur.

15) Pellet üzerine 100 µl, 0,1 mM EDTA'lı serum fizyolojik solüsyon eklenmiştir.

16) On beş dakika, 55 °C' de kuru blokta inkübe edilmiştir.

17) Tüm RNA örnekleri çoğaltma işlemine kadar -80°C' de bekletilmiştir.

3. 2. 7. Ters Transkriptaz PZR ile cDNA Eldesi

Total RNA' dan komplementer DNA (cDNA) elde edilmesi için Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PZR (AMV) (Roche, Almanya) kullanılmıştır. Prosedür A uygulanmıştır. Özgül olmayan randomize primer dizisi kullanılarak, 25 ve 45⁰C'lik iki inkübasyon ile işlem tamamlanmaktadır. Kullanılan ticari kit protokolüne uygun olarak hazırlanan reaksiyon karışımları;

Tablo 3.2: PZR Reaksiyon Karışımı (1. Tur) (cDNA Eldesi İçin)

1. KARIŞIM	1X	12X
Total RNA	3 µl	36 µl
Primer (anchored-oligo(dT) ₁₈ primer)	1 µl	12 µl
Su	9 µl	108 µl
SON HACİM	13 µl	156 µl

Tablo 3.3: PZR Reaksiyon Karışımı (2.Tur) (cDNA Eldesi İçin)

2. KARIŞIM	1X	12X
Transkriptör ters transkriptaz reaksiyon tamponu (5X)	4 µl	48 µl
RNaz inhibitörü (40U/µl)	0.5 µl	6 µl
Deoksinükleotid karışımı (10mM)	2 µl	24 µl
Transkriptör ters transkriptaz (20U/µl)	0.5 µl	12 µl
SON HACİM	20 µl	240 µl

Testin uygulanışı;

1. Ependorflara, hazırlanan ilk reaksiyon karışımından 13' er µl dağıtılmıştır. Nazikçe santrifüj yapılmıştır.

2. Ependorf içerisindeki 1. Reaksiyon karışımı, kuru blokta 65°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Örnekler santrifüj edilmiştir.

3. Ependorflar hızlı bir şekilde buza yerleştirilmiştir ve buz üzerinde ependorflara 2. Reaksiyon karışımından 7'şer µl eklenmiştir. Örnekler santrifüj edilmiştir.

4. Ependorf içerisindeki reaksiyon karışımı, kuru blokta 55°C'de 30 dk inkübe edilmiştir.

5. Örnekler kuru blokta 55°C'den sonra 85°C'de 5 dk inkübe edilmiş ve buz üzerine konmuştur.

6. Elde edilen cDNA 'lar spin santrifüj edilmiş, daha sonra kullanılmak üzere -20 °C' de saklanmıştır.

3. 2. 8. IL-17' yi Kodlayan cDNA' ların Gerçek Zamanlı PZR Cihazında Çoğaltılması

IL-17 için en az 10ng cDNA kullanılmıştır. cDNA LightCycler cihazı (Roche diagnostics, Tenay, Turkey) ve LightCycler yazılımının 3.5 versiyonu kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PZR amplifikasyon karışımı, kalıp

cDNA, FastStart DNA Master HybProbe karışım tamponu, IL-17 ile işaretli TaqMan probu ve her bir primerden (Forward ve Reverse primerler (Eurogentec, Belçika) 20pmol içerecek şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon 2 aşamada gerçekleştirilmiştir; denatürasyon (95°C'de 15 saniye, sıcaklık değişimi 20°C/saniye), hibridizasyon (60°C'de, sıcaklık değişimi 20°C/saniye) Gerçek zamanlı PZR amplifikasyonu sonrasında, erime eğrisi analizleri incelenmiştir.

Tablo 3.4: IL-17 için Real Time PZR Reaksiyon Karışımı

KARIŞIM	X	12X
Su	2 µl	24 µl
MgCL₂	1 µl	12 µl
IL-17 Primer (forward)	1 µl	12 µl
IL-17 Primer (reverse)	1 µl	12 µl
IL-17 TaqMan Prob	0,5 µl	6 µl
Master Miks	2 µl	24 µl
Toplam Hacim	7,5 µl	90 µl

Her örnek için hazırlanan ana karışımdan 7,5 µl, cDNA' dan ise 2, 5 µl kapillere eklenmiştir. Örnekler hızlı bir şekilde spin santrifüj edilerek LightCycler ® 2.0 (Roche, Almanya) cihazına yerleştirilip işlem başlatılmıştır.

Böbrek dokusunda IL-17 gen ifadenmesi Gerçek zamanlı PZR ile araştırılmıştır. Gerçek zamanlı PZR ile çalışılacak sitokine ait primer dizileri tablo 3.5' te gösterilmiştir.

Tablo 3.5: IL-17 Sitokin Real Time PZR Çalışmasında Kullanılan Primer Dizileri

Sitokin	Primer Diziler
IL-17 Forward	5' CTC-AGA-CTA-CCT-CAA-CCG-TTC 3'
IL-17 Reverse	5' GTG-CCT-CCC-AGA-TCA-CAG-AAG 3'

Tablo 3.6: Gerçek Zamanlı PZR' da Kullanılan LightCycler Yazılım Raporu

LightCycler Software Version 4.0



Report

28.10.2009

Experiment

Creation Date	28.10.2009 14:49:16	Last Modified Date	28.10.2009 16:59:13
Operator	System Admin	Owner	System Admin
Start Time	28.10.2009 15:42:40	End Time	28.10.2009 16:59:13
Run State	Completed	Software Version	LCS4 4.0.0.23
Macro		Macro Owner	
Templates	taqman		
Run Notes			

Programs

Program Name	Denaturation					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:10:00	20	0	0	0	None

Program Name	Amplification					
Cycles	50	Analysis Mode	Quantification			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:10	20	0	0	0	None
60	00:00:40	20	0	0	0	Single

Program Name	Cooling					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
40	00:00:00	20	0	0	0	None

Instrument

Type	6 Ch.	Serial Number	LC_6714
------	-------	---------------	---------

3. 2. 9. Kontaminasyona Karşı Koruma

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

3. 2. 10. İstatistiksel Analiz

IL-17 gen ifadenmesinin analizinde kontrol ve *Candida* ile infekte grup karşılaştırılması Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

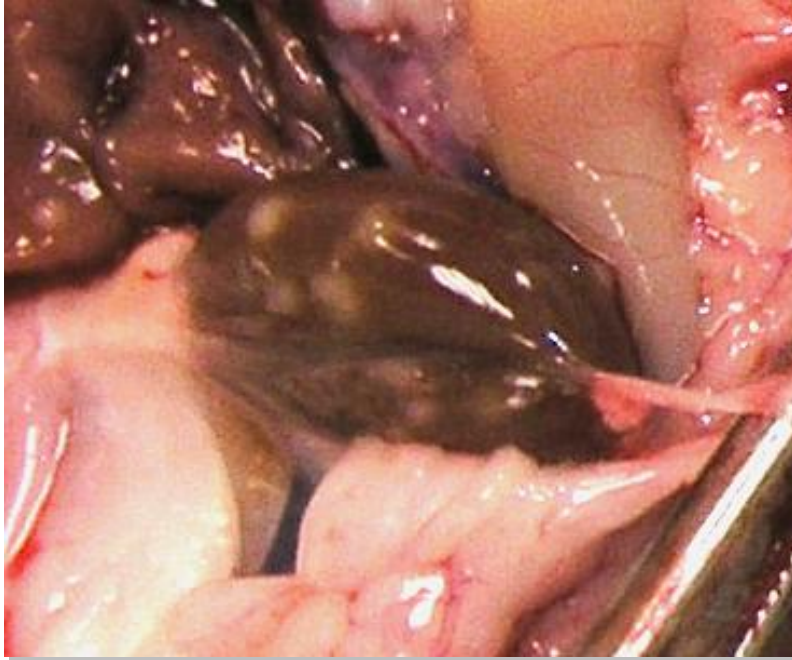
4. BULGULAR

4. 1. Nötropenin Gösterilmesi

Hayvanlardan alınan kan örneklerinden yapılan periferik yayma preparatında, infekte grubun nötropenik olduğu görülmüştür.

4. 2. Kandidozun Doğrulanması

Bütün dokularda histopatolojik inceleme, kültür ve moleküler yöntemler ile infeksiyon tanısı doğrulanmıştır. Deneklerin doku örneklerinin kültürlerinde *C. albicans* kolonileri üretilmiştir. Böbrek dokularındaki DNA varlığının pozitifliğini göstermek amaçlı bakılan β -aktin kontrol ve infekte örneklerde pozitif olarak bulunmuştur. Bütün dokulardan elde edilen DNA'lar fungal primerler ile çoğaltıldığında *Candida* ile infekte grubun tamamında pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Kontrol grubunda, böbrek dokusunda fungal DNA görülmemiştir.



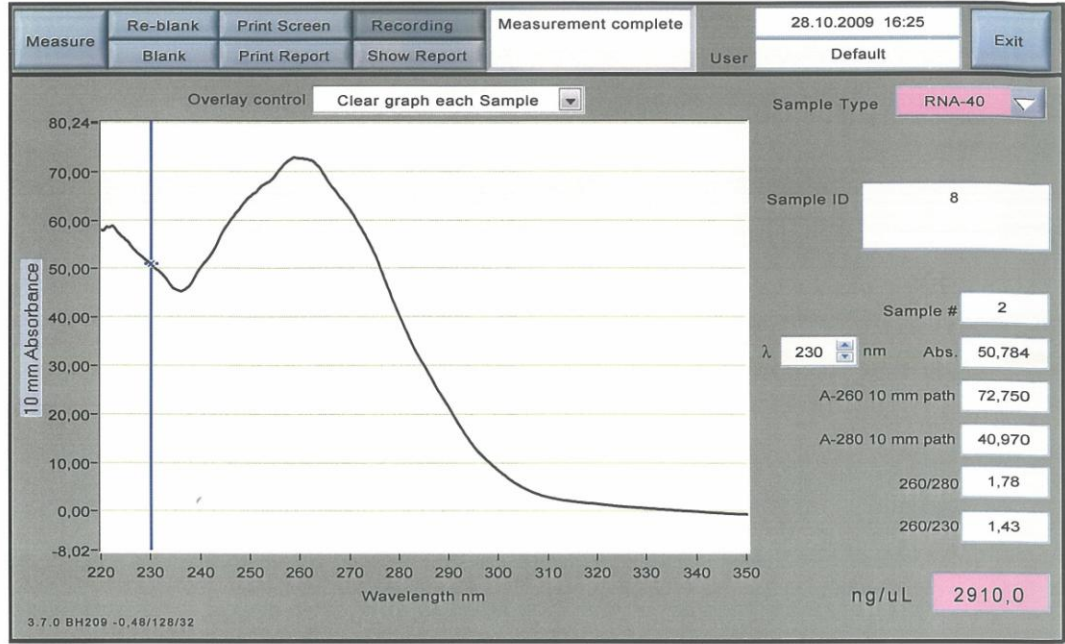
Resim 4.1: Kandidoz Oluşturulmuş Deney Hayvanlarında Böbrek İnfeksiyon Odakları

4. 3. RNA Varlığının Gösterilmesi

Ticari kit ile izolasyonu yapılan infekte grup örneklerindeki RNA varlığı, NanoDrop (Thermo Scientific, ABD) cihazı ile ölçülerek tespit edilmiştir.

Tablo 4.1: Kandidozlu Böbrek Dokularından Elde Edilen RNA Miktarları

ÖRNEK NUMARALARI	RNA MİKTARLARI
1	913.7 ng/μl
2	1437.2 ng/μl
3	1244.3 ng/μl
4	496.3 ng/μl
5	1269.8 ng/μl
6	151.8 ng/μl
7	4173.4 ng/μl
8	2910.0 ng/μl
9	3558.0 ng/μl
10	3839.2 ng/μl
11	3726.2 ng/μl
12	3856.0 ng/μl



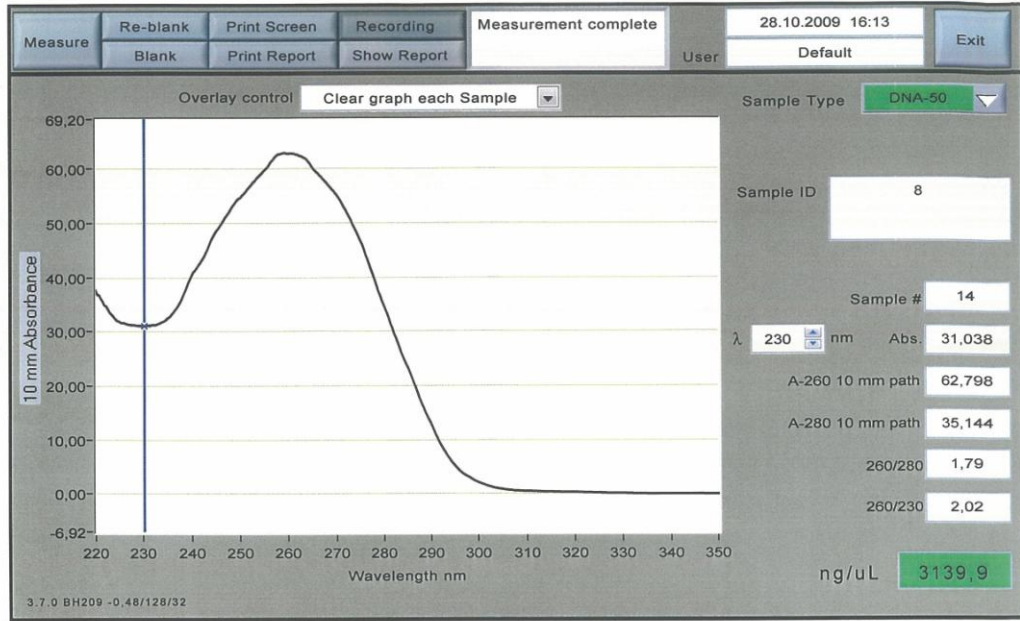
Grafik 4.1 NanoDrop analiz ekranı örnek RNA ölçüm görüntüsü

4. 4. DNA Varlığının Gösterilmesi

Böbrek dokularından oluşturulan RNA'lardan ticari kit kullanılarak cDNA elde edilmiştir. RNA gibi cDNA varlığı da, NanoDrop cihazı (Thermo Scientific, ABD) ile ölçülerek tespit edilmiştir.

Tablo 4.2: RNA' dan RT-PZR İle Elde Edilen cDNA Miktarları

ÖRNEK NUMARALARI	cDNA MİKTARLARI
1	2752.7 ng/μl
2	2654.4 ng/μl
3	2706.4 ng/μl
4	2668.3 ng/μl
5	2746.4 ng/μl
6	2217.3 ng/μl
7	3416.7 ng/μl
8	3139.9 ng/μl
9	3173.1 ng/μl
10	3180.5 ng/μl
11	3024.2 ng/μl
12	3552.5 ng/μl

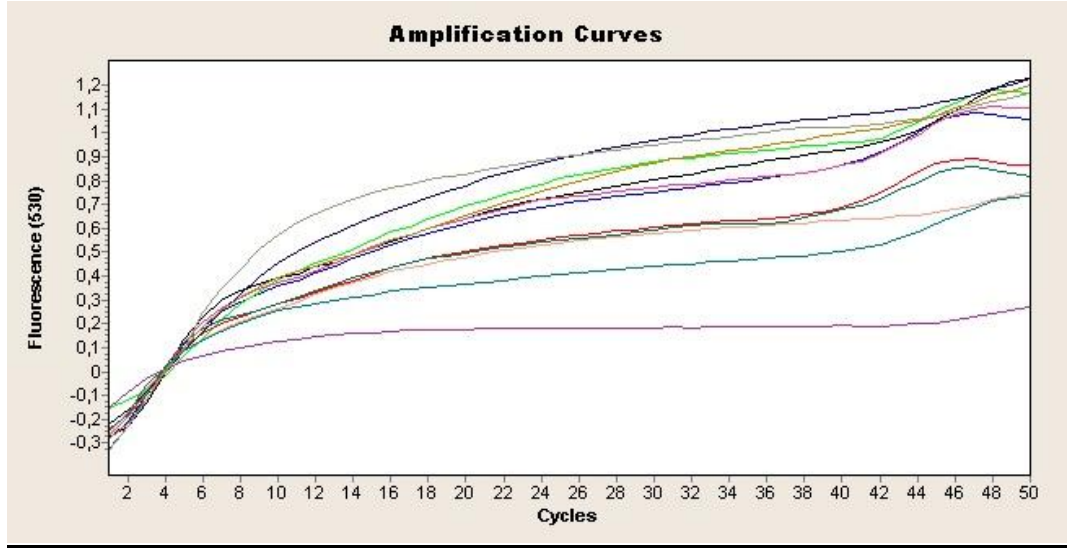


Grafik 4.2 NanoDrop analiz ekranı örnek DNA ölçüm görüntüsü

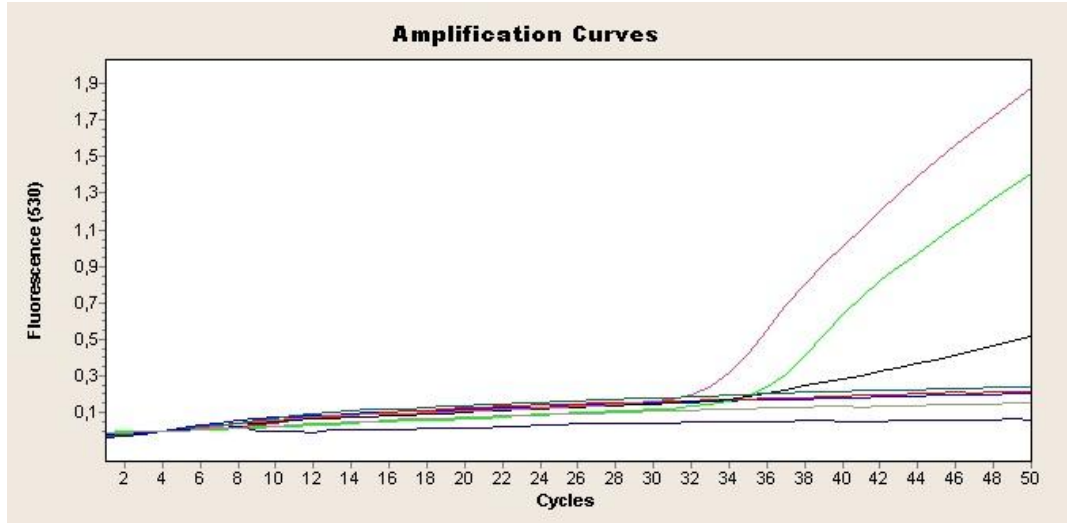
4. 5. Gerçek Zamanlı PZR' da IL-17 Gen İfadelenmesinin Analizi

Klinik örneklerden önce bir cDNA havuzunun 6 farklı dilüsyonu üç farklı kopya olarak ölçülmüş ve floresansın başladığı siklus sayısı (Cp) ile gen ifadesinin logaritmik artışı arasında lineer regresyonla, kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

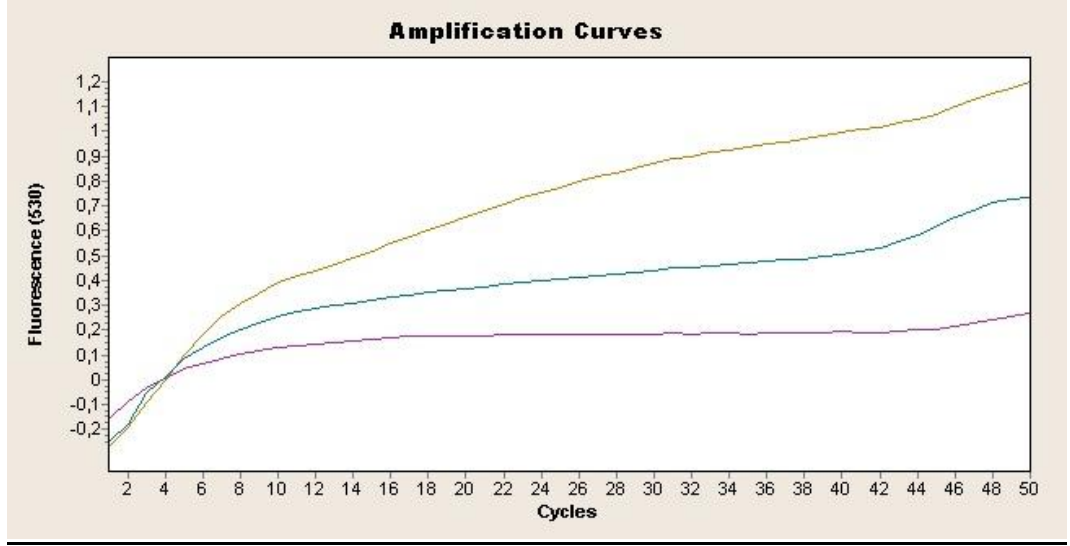
Genlerin sayısal analizi için yapılan mutlak ölçüm (absolute quantification) sırasında, örnekteki hedef ile daha önce konsantrasyonu bilinen aynı hedefin standart eğrisi karşılaştırılmıştır. Standart eğriler, 10 kat seri dilüsyonlarla (10^2 - 10^{10} kopya/ μ l), kopyalar ölçülerek (kuantifiye edilerek) oluşturulmuştur. IL-17 gen ifadenmesi miktarı kopya/ml olarak ölçülmüştür.



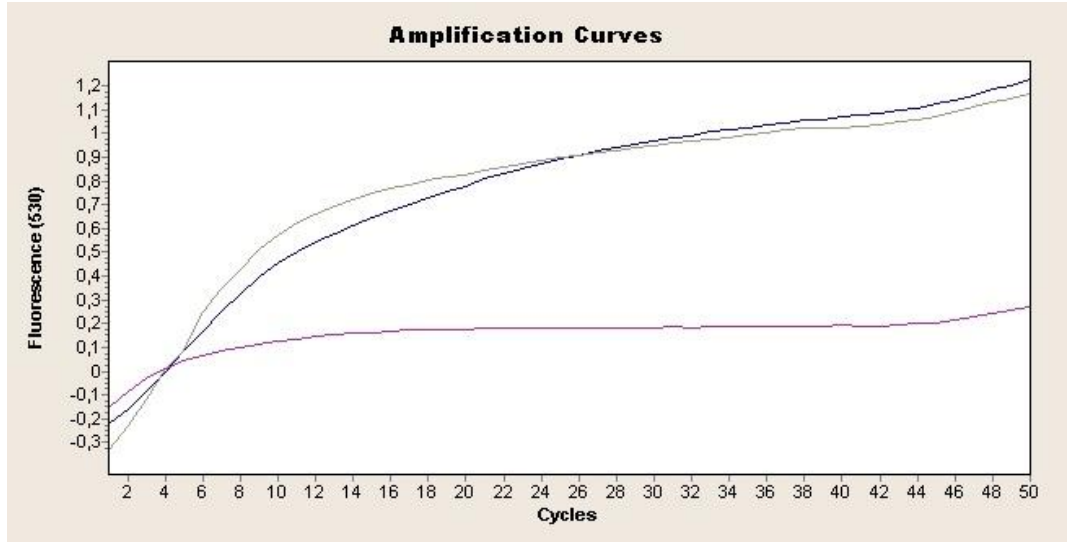
Grafik 4.3: Bütün *Candida* Örneklerinin Amplifikasyon Eğrileri



Grafik 4.4: *Candida* Örneklerinin Amplifikasyon Eğrileri



Grafik 4.5: Üç Farklı *Candida* Örneğinin Amplifikasyon Eğrileri



Grafik 4.6: Üç Farklı *Candida* Örneğinin Amplifikasyon Eğrileri

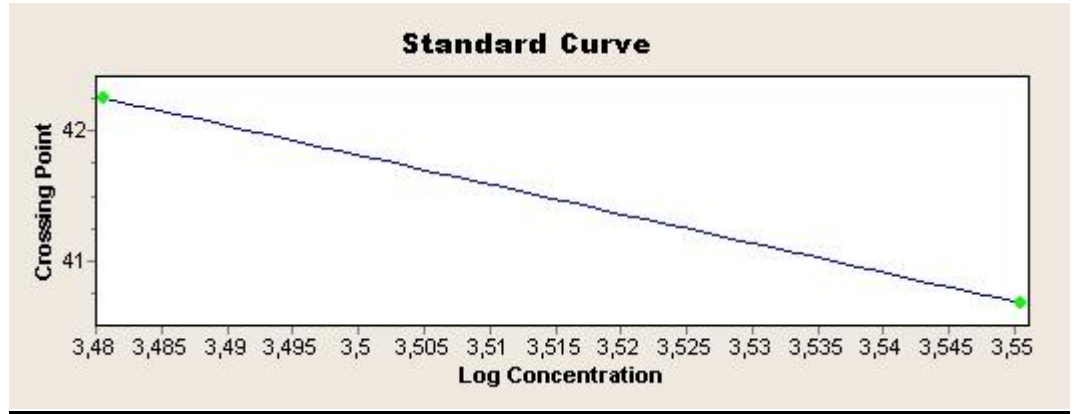
4. 5. 1. Kantitasyon Sonuçları

Candida ile infekte grupta IL-17 gen ifadenmesi 12 örneğin 10' unda (%83.3) görülmüştür. Kontrol grubu örneklerinde ise IL-17 gen ifadenmesi hiçbir örnekte görülmemiştir.

Tablo 4.3: IL-17 için Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları

ÖRNEK	cDNA MİKTARI	CP	KONSANTRASYON	STANDART
1	2752.7 ng/μl	39.13	4.17x10 ³ kopya/mL	-
2	2654.4 ng/μl	40.64	3.57 x10 ³ kopya/mL	-
3	2706.4 ng/μl	38.57	4.41 x10 ³ kopya/mL	-
4	2668.3 ng/μl	41.65	3.22 x10 ³ kopya/mL	-
5	2746.4 ng/μl	39.58	3.98 x10 ³ kopya/mL	-
6	2217.3 ng/μl	38.33	4.53 x10 ³ kopya/mL	-
7	3416.7 ng/μl	-	-	-
8	3139.9 ng/μl	42.16	3.05 x10 ³ kopya/mL	-
9	3173.1 ng/μl	44.59	2.37 x10 ³ kopya/mL	-
10	3180.5 ng/μl	-	-	-
11	3024.2 ng/μl	42.24	3.02 x10 ³ kopya/mL	St. 3.02x10 ³ kopya/mL
12	3552.5 ng/μl	40.68	3.55 x10 ³ kopya/mL	St. 3.55x10 ³ kopya/mL

Standart olarak kullanılan örneklerin cDNA konsantrasyonları ile amplifikasyon sırasındaki Cp dereceleri karşılaştırılarak standart eğrisi çizilmiştir.



Grafik 4.7: Kantitasyonda Yararlanılan Standart Eğri

5. TARTIŞMA

C. albicans mukozal yüzeylerde kommensal olarak yaşayan, ancak zayıf bağışıklık durumunda konak için invaziv ve patojen hale gelebilen ve ölümcül sistemik infeksiyonlara sebep olan bir mantardır. Tedavide yaygın olarak kullanılan antifungal ajanlara karşı direnç her gün arttığından, *C. albicans* klinikte, AIDS hastaları ve granülositopenik hastalar için büyük bir problem teşkil etmektedir.

Fungal infeksiyonların tanısı, tedavide izlenecek yolun belirlenmesi açısından kritik öneme sahiptir. Mantar infeksiyonlarının tanısı, klasik olarak kültürden etkenin izolasyonu ve tanımlanması, serolojik olarak mantar ürünlerinin gösterilmesi, histopatolojik preparatlarda mantarlara ait hiflerin veya hücrelerin görülmesi, radyolojik olarak özgül görüntülerin saptanması eşliğinde klinik bulgular ile konmaktadır.⁷⁴ Moleküler yöntemler, yüksek özgüllük ve duyarlılıkları ile son yıllarda bütün infeksiyon hastalıklarında olduğu gibi, mantar infeksiyonlarında da tanı koydurucu avantajlar sunmaktadır.⁷⁵ Özellikle kültürde üretilmeyen etkenlerin moleküler yöntemler kullanılarak gösterilmesi tanıda önemli avantajlar getirmiştir. Etken kültürde üretilse bile tür tanımı yapılması için moleküler yöntemlerden faydalanılabilir.⁷⁶

Çeşitli hasta gruplarında etken tanımlamada kullanılan panfungal PZR yönteminin tanıya yardımcı olduğu çalışmalarda bildirilmiştir. Burik ve ark. yaptığı çalışmada, insan kan kültürlerinde panfungal PZR yöntemi ile türe özgü primerler kullanarak fungal DNA' lar elde edilip infeksiyon etkenleri gösterilmiştir.⁷⁷

Begss ve ark. oral kandidozda, *C. albicans*' a ait genlerin farklılıklarını göstermek amacıyla RT-PZR yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada, DNA eldesini β -aktin geni ile göstermişlerdir.⁷⁸ Benzer olarak Okeke ve ark. da kutanöz kandidozda DNA varlığını β -aktin geni ile belirlemişlerdir.⁷⁹

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

Villar ve ark. *C. albicans*' ın konak hücre ve dokularını istila ettikten sonra, konak epitelyal ve endotelyal hücrelerinden salınan proinflamatuvar sitokinleri araştırmışlardır. *C. albicans*'ın konak hücre ve dokusuna invazyonu ile oluşan infeksiyona karşı konak proinflamatuvar cevabını arttırdığını ifade etmişlerdir.⁸⁰

1986 yılında, farelerde ve insanlarda yapılan çalışmalar sonucunda Th hücrelerinin sitokin üretimine göre, Th1 ve Th2 alt gruplarına ayrıldığı gösterilmiştir. Böylelikle sitokinler ile çeşitli hastalıklar arasındaki ilişkiler anlaşılmaya başlanmıştır.⁴

Th1 yanıtı, IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α gibi sitokinlerin üretimi ile gerçekleşir ve yeniden infeksiyonun oluşumuna karşı direnç sağlar. Th2

yanıtında, IL-4, IL-10, IL-6 üretimi görülür ve kronik hastalıkların gelişimi ile ilişkilidir. Th1 sitokinleri hücre sel bağışık yanıtı, Th2 sitokinleri ise humoral bağışık yanıtı uyarır. Th1 ve Th2 sitokin profil analizleri, birçok hastalıktaki bağışık yanıtı belirlemede kullanılmaktadır.

Steinshamn ve ark. yaptıkları bir çalışmada, normal ve granülositopenik farelerde oluşturulan *C. albicans* enfeksiyonunda proinflamatuvar sitokin olan TNF- α ve bazı çalışmalarda proinflamatuvar bazılarında antiinflamatuvar sitokin olarak belirtilen IL-6 düzeyleri araştırmışlardır. Endojen IL-6 literatürlerde, proinflamatuvar veya anti inflamatuvar sitokin olarak tam olarak tanımlanmaktadır.⁸¹ Steinshamn'ın çalışmasında, granülositopenik farelerin serumlarında TNF- α ve IL-6 düzeylerinin normal farelere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak TNF- α düzeylerinin yüksek olması, *C. albicans* çoğalmasında bir azalma meydana getirmemiştir. Araştırmacılar çalışmalarında, TNF- α varlığının infekte grupta artış gösterdiğini belirlemiş olsalar da, TNF- α varlığının farelerdeki yaşam sürelerini etkilemediğini bildirmişlerdir. IL-6 düzeyinin ise *C. albicans* enfeksiyonlarında arttığını, fakat mekanizmasının net olarak bilinmediği belirtilmiştir.⁸²

Louie ve ark. yaptıkları çalışmada, *C. albicans* ile infekte farelerin serumlarında TNF- α miktarlarının giderek artış gösterdiği, infekte olmayan farelerde ise hiçbir artışın görülmediği bildirilmektedir. Aynı zamanda TNF- α 'nın varlığının organlardaki fungal yükü azaltarak konak savunmasında olumlu katkıları olduğu bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar, TNF- α 'nın, periferik kandaki lökosit sayısını ve infekte dokulardaki inflamatuvar cevabı etkilemediğini bulmuşlardır. Aynı çalışma sırasında yapılan bir in vitro deneyde, TNF- α 'nın direk antikandidal etkisinin olmadığı gösterilmiştir.⁸³

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

Riipi ve ark. yaptıkları çalışmada, kandidoz oluşturulmuş farelerde TNF- α seviyesinin artış gösterdiğini ve *C. albicans*'ın neden olduğu akut faz proteinlerinden fibrinojenin artışında TNF- α 'nın rolü olduğunu bildirmişlerdir.⁸⁴

Bazı proinflamatuvar sitokinlerin etkinliği ve akut infeksiyon anındaki değişimleri Gaforio ve ark. tarafından 2002'de gösterilmiştir. Kandidozdan 24 saat sonra ve LPS ile uyarım sonucunda TNF- α seviyelerinin kontrole oranla arttığını bildirmişlerdir.⁸⁵

Kubota ve ark. sistemik kandidozdaki değişimlerden akut akciğer hasarından, alveolar makrofajlardan salınan TNF- α seviyesinde artışının neden olduğunu bildirmişlerdir.⁸⁶

Benzer bir sonuç da Steele ve ark. tarafından yapılan deneylerde bildirilmiştir. Vajinal ve oral kandidoza karşı oluşan lokal bağışık yanıtta TNF- α 'nın önemli olduğu gösterilmiştir.⁸⁷

Kalkancı'nın yaptığı tez çalışmasında da deney hayvanlarında değişik *Candida* türlerinin TNF- α düzeylerinde belirgin bir artışa neden olduğu belirlenmiştir.⁸⁸

Romani ve ark. IFN- γ 'nın Th1 yanıtını düzenleyen, Th2 yanıtını baskılayan pleomorfik bir sitokin olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca endotelial hücrelerin kandidal hasardan korunmasında IFN- γ 'nın rolü olduğu gösterilmiştir.^{89, 90}

Lavigne ve ark. da çalışmalarında IL-12 ve IFN- γ 'nın ortaklaşa çalışarak doğal ve kazanılmış bağışık yanıt meydana getirdiklerini, IFN- γ 'nın *Candida* infeksiyonuna dirençte rol oynadığını bildirmişlerdir.⁹¹

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 anti inflamatuvar yanıtın düzenlendiğini bildirmişlerdir.^{92, 93}

Schaller ve ark. farelerde yaptıkları deneylerde, infekte olmayan hayvanlarda oral mukozada düşük seviyelerde IFN- γ , TNF- α , IL-6 ve IL-10 düzeyi beklerken; kandidozlu ve PMN eksikliği olan hayvanlarda IFN- γ , TNF- α , IL-6 seviyelerinde artış, IL-10 seviyesinde değişiklik olmadığını belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar tarafından, PMN ilavesi ile birlikte artan IFN- γ , TNF- α , azalan IL-10 seviyeleri belirlenmiştir.⁹⁴

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

Badiee ve ark.'nın karaciğer nakli sonucu gelişen invaziv fungal infeksiyonları araştırdığı bir çalışmada klinik örnekler PZR/ELISA metotları kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca kan örnekleri BACTEC sistemi kullanılarak da belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre PZR/ELISA metotlarının karaciğer nakli sonrası gelişen invaziv fungal infeksiyonların erken dönem tanısında yeterli özgüllükte olmadıkları belirlenmiştir.⁹⁶

Valdez ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, *C. albicans*' ın (ısı ile öldürülmüş veya canlı) farklı dozlarının etkilerinin hücresel ve humoral bağışıklığın oluşması üzerine etkilerine bakılmıştır. Hücresel bağışıklığın etkileri, farelere değişen dozlarda *C. albicans* verilerek saptanmıştır ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonları için kontrol edilmiştir. Humoral bağışıklık *C. albicans*' ın farklı dozları ile dalak mononükleer hücrelerinin karşılaştırılması ile incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına bakılarak, farklı dozlarda mayanın farelere verilmesinin hücresel ve humoral yanıtı

baskıladığı (özellikle canlı olarak 106-108 uygulanması), ölü olarak uygulanan mayanın her iki cevabı da arttırdığı gösterilmiştir.⁹⁷

Van't ve ark. yapmış olduğu bir çalışmalarında öldürücü *C. albicans* infeksiyonunda nötropenik farelerin hayatta kalma süreleri üzerine IL-1 β 'nın etkisini incelemişlerdir. Nötropeniye sokulan farelere *Candida* infeksiyonundan 6 saat sonra ya da 1-2 saat önce IL-1 β verilmiş ve hayatta kalma süreleri kontrol hayvanlarla karşılaştırılmıştır. İnfeksiyonun 24. saatinde %97, 48. saatinde %70, 72. saatinde ise %23'ünün hayatta kaldığı görülmüştür. Sonuç olarak bu çalışma ile IL-1 β 'nin öldürücü *C. albicans* infeksiyonu olan nötropenik farelerin yaşam sürelerini uzattığı gösterilmiştir.⁹⁸

Elahi ve ark. tarafından, *Candida* infeksiyonlarına duyarlı ve dirençli iki farklı fare modelinde yapılan çalışmada, infeksiyona dirençli grupta IL-4, IL-12 ve IFN- γ düzeylerinde, *C. albicans*'ın hızlı eliminasyonu ile uyumlu olarak erken dönemde artış olduğu; duyarlı grupta ise IL-4 ifadenmesinin geciktiği ve daha az olduğu belirlenmiş ve *C. albicans*'ın hızlı eliminasyonunun IFN- γ , IL-12 gibi sitokinlerin erken salınımını sağladığı bildirilmiştir.⁹⁹

Spellberg ve ark. yaptıkları çalışmada, kandidozlu fare modelinde konak yaşamı ile böbrek ve dalak bağışıklık yanıtı arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. İnfekte farelerde, dalak ve böbrek lenfositlerinin hücre içi içerikleri ile bütün organların sitokin profilleri belirlenmiştir. Fare açısından öldürücü olan ve olmayan inokulasyonların ikisinde de yabancı tip maya hücrelerinin dalakta Th2 cevabını arttırdığı görülmüştür. Hif oluşturma eksikliği bulunan maya hücre mutantlarının ise değişiklik

oluşturmadığı görülmüştür. Sistemik infeksiyonda konağın hayatta kalma süresinin bağışık yanıtın tipi ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Bu araştırmanın sonuçları, dokularda hif formundaki *C. albicans*' ın in vivo koşullarda Th2, özellikle de IL-10 yanıtını arttırdığını göstermektedir.¹⁰⁰

Stuyt ve ark. infeksiyon oluşturmak için farelere *C. albicans*'ı intravenöz olarak enjekte etmişlerdir. Ayrıca farelere anti IL-18 antikoru da verilmiştir. Anti IL-18 antikoru böbreklerde maya yükünü arttırmıştır. IFN- γ defekti olan fareler anti IL-18 antikoru ile tedavi edildiğinde *Candida*' ılı organ yüküne hiçbir etki etmemişlerdir. Araştırmacılar, IL-18'in koruyucu etkisinin endojen kaynaklı IFN- γ aracılığıyla olduğunu öne sürmüşlerdir.¹⁰¹

Stockinger ve ark. 2006 yılında, farenin naif CD4⁺ T hücrelerini in vitro ortamda TCR aracılığıyla indükleyerek Th17 hücrelerini ilk defa gösterebilmişlerdir.^{45, 46, 47, 55, 58, 59, 60}

Zhou ve ark. insan periferik kan mononükleer hücreleri (PBMCs) anti-CD3 ve anti-CD28 ile uyardıktan sonra, IL-17'nin yüksek seviyelerini ve IL-17 üreten hücrelerin yüksek frekanslarını, ELISA ve ELISPOT yöntemleriyle tespit etmişlerdir. IL-17 üreten hücrelerin detaylı analizi, flow sitometri yöntemiyle gösterilmiştir. IL-17 üretimi için ana katkının CD4⁺ T hücreleri tarafından oluşturulduğu flow sitometri yöntemiyle anlaşılmıştır. Bu hücreler, protein ve transkripsiyonel düzeyde saflaştırılmış olarak, IL-17 üretimini doğrudan indükleyebilmektedir. Ayrıca, IL-17 üreten CD4⁺ T hücrelerinin çoğu fenotipik analizlerle ortaya çıkmıştır. Bu çalışma, hafıza Th17 hücrelerinin sağlıklı bireylerin PBMC'lerinde sunulduğunu ve bazı hafıza Th17 hücrelerinin *C. albicans* gibi

mantar infeksiyonlarına karşı savunmada önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.¹⁰²

Huang ve ark. farelerde sistemik anti-*C. albicans* konak savunması için IL-17A gerekliliğini araştırmışlardır. Fare (m) IL-17A/mIL-17A reseptör (R) etkileşimlerinin sistemik kandidozlu fare modelinde rolünü değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, mIL-17A sitokinine ELISA yöntemi ile bakmışlardır. IL17-AR^{-/-} fare böbreklerinde fungal yük önemli ölçüde artmıştır. IL17-AR^{-/-} farelerde, periferik nötrofilin mobilizasyonu ve infekte organlara girişi anlamlı olarak azalmış ve gecikmiş bulunmuştur. İn vivo mIL-17A' nın ifadesi *C. albicans*' ın letal dozunda normal fareleri korumaktadır. (7.günde %100 ve 42. Günde %65) Sonuç olarak, mIL-17A/mIL-17AR sisteminin in vivo şartlar altında, normal konak savunması için gerekli olduğunu söylemişlerdir. IL-17A sistemik *Candida* infeksiyonları için sitokin bazlı tedavilerde bir seçenek olabilir.¹⁰³

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.¹⁰⁴

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* infeksiyonu 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

proteinini anlamlı derecede düşük seviyelerde üretmişlerdir. *Candida* ile infekte immünokomponent hastalardan alınan PBMC'ler IL-17 ve IL-22' yi daha fazla üretmişlerdir.¹⁰⁵

Zelante ve ark. farelerde yaptıkları çalışmada, IL-23 ve IL-17 salınımı sonrasında *C. albicans* ve *Aspergillus fumigatus* infeksiyonlarına karşı oluşan direncin büyük bir şekilde artmış olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu da ilgili hedef organda fungal büyüme azalması olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada sunulan veriler fungal infeksiyonlarında 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 infeksiyonlarının tedavisinde yeni stratejiler geliştirilmesinde fikir verebileceği düşünülmüştür.¹⁰⁶

Yaptığımız çalışmada da kandidoz oluşturulmuş deney hayvanlarında IL-17 seviyelerinde artış görülmüş ve yukarıda bahsedilen çalışmayla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Chen ve ark. sağlıklı bireylerde yaptıkları çalışmada, periferik kandan izole edilen naif ve hafıza CD4⁺ T hücrelerini incelemişlerdir. CD3/CD28 uyarımına yanıt olarak, insan hafıza T hücreleri IL-17' yi hızlı bir şekilde, naif CD4⁺ T hücreleri ise düşük düzeyde üretmiştir. TGF- β 1 ve IL-6, ROR γ t ifadenmesinin düzenlenmesini arttırmışlardır. Fakat naif CD4⁺ T hücrelerinin Th17 hücrelerine farklılaşmasını uyarmamıştır. Ancak IL-23 kendi reseptörünü düzenlenmesinde rol oynamış ve IL-17 ve IL-22' nin önemli uyarıcısı olmuştur.¹⁰⁷

Rowan ve ark. yaptıkları çalışmada Hepatit C virüsü (HCV) ile infekte hastaların ve sağlıklı bireylerin periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) IL-17 üretimini baskılayan IL-10 ve TGF- β ' yi araştırmışlardır. IL-10' un inhibitör etkisinin ağırlıklı olarak antijen sunucu hücreler aracılığı ile gerçekleştiğini ifade etmişlerdir. HCV ile infekte hastalarda enfeksiyon sırasında, antijene spesifik Th17 hücreleri uyarılmaktadır ve bu hücreler IL-10 ve TGF- β ile düzenlenmektedir. Araştırmacılar doğal anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10 ve TGF- β ' nin HCV ile uyarılmış Th17' yi baskıladığını söylemişlerdir.¹⁰⁸

Candida enfeksiyonunda IL-17' nin rolünün belirlenmesi açısından yaptığımız çalışmada, *C. albicans* ile infekte olan grubun %83,3' ünde IL-17 ifadenmesi Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile tespit edilmiştir. Buna karşın kontrol grubunda IL-17 ifadenmesi tespit edilmemiştir. Bu verilere göre *Candida* enfeksiyonu sırasında IL-17 yanıtında belirgin bir artış görülmektedir. Dolayısıyla, *C. albicans* patogeneğinde IL-17' nin etkin bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Ge ve ark. çalışmalarında, kronik hepatit B virüs enfeksiyonu olan aktif hastalarda periferik Th1 ve Th17 hücrelerinin bağışıklık durumunu değerlendirmeyi amaçlamışlardır. ELISA, PZR ve flow sitometri yöntemini kullanmışlardır. Kronik hepatit B hastalarında (CHB) periferik kan Th17 hücrelerinin yüzdesinde kontrol grubuna göre önemli ölçüde artış görülmüştür. Buna rağmen Th1 ve Tc1 hücrelerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Sonuç olarak, Th17' nin kronik HBV enfeksiyonunda potansiyel rolüne dikkat çekilmiştir.¹⁰⁹

Zhang ve ark. kronik hepatit B virüs ile infekte grup ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırarak periferik ve intrahepatik Th17 hücrelerini analiz etmişlerdir. Th17 hücrelerinin dolaşımdaki frekansının kontrol grubu göz önüne alınarak, hastalığın ilerlemesi ile artışı gözlenmiştir. Th17 hücreleri aynı zamanda kronik hepatit B (CHB) hastalarının karaciğerinde büyük ölçüde birikmiş olduğu saptanmıştır. Th17 hücreleri plazma viral yükü ve histolojik aktivite durumu ile pozitif ilişkili olduğu söylenmiştir. İn vitro olarak, IL-17, CHB hastalarında ve sağlıklı bireylerde proinflamatuvar sitokinlerin üretim kapasitesini arttırmak ve miyeloid dendritik hücreler ile monositleri aktive etmek olarak tanımlanabilmektedir. Ayrıca Th17 ilişkili sitokinlerinde CBH hastalarında artmış olduğu gözlenmiştir.¹¹⁰

Çalışmamızı mantar infeksiyonlarının patogeneğinde IL-17' yi, Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile belirleyen ilk çalışmalardan olması açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz. Bundan sonra çalışmada örnek sayısını arttırarak ve infeksiyonun değişik dönemlerinde IL-17 ifadenmesinin belirlenmesi ve elde edilen verilerin insan çalışmalarıyla desteklenmesine yönelinilecektir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre mantar infeksiyonu oluşumunda son yıllarda tanımlanan IL-17' nin etkin bir rol oynadığı düşünülmektedir. Özellikle immün sistemi baskılanmış hastalardaki *Candida* infeksiyonlarının tedavisinde sitokin bazlı yaklaşımların yeni bir hedefi olarak düşünülebilir.

6. SONUÇ

Candida ve bağışıklık sisteminin elemanları arasındaki ilişkinin çok karmaşık olduğu düşünülmektedir. Bu ilişkide tek bir hücrenin ya da hücre elemanının rolü yoktur. Aksine birden çok yapı birbiriyle dengeli bir ilişki içindedir. Son yıllarda ortaya çıkan, Th hücrelerinin alt grubu olan Th17 hücreleri tanımlanmıştır. Bu hücrelerden infeksiyon sırasında salınan ana sitokin IL-17'dir.

Bu çalışma kandidozlu sıçan böbrek dokularında IL-17 sitokin ifadenmesinin gösterilmesini amaçlamıştır. Buradan yola çıkarak kandidozlu böbrek dokularında sitokin ifadenmesi moleküler yöntemlerle elde edilmiştir. Moleküler yöntem olarak TaqMan probolar kullanılarak Gerçek zamanlı PZR tercih edilmiştir.

Çalışmaya iki grup halinde 20 örnek dahil edilmiştir. Bunların 8 tanesi sağlıklı kontrol grubu, diğer 12 tanesi de kandidozlu grup olarak ayrılmıştır.

Tüm örneklerden RNA ve cDNA elde edilmiştir. İnfekte grupta RNA miktarları 151,8-4173,4 ng/µl arasında, cDNA miktarları ise 2217,3-3552,5 ng/µl arasında bulunmuştur.

İnfekte grup örnekleri IL-17 için, Cp değerleri 38,33 ile 44,59, konsantrasyon miktarları ise $2,37 \times 10^3$ ile $4,53 \times 10^3$ arasında bulunmuştur. İki örnekte Cp değerleri ve konsantrasyon miktarları elde edilememiştir.

Kontrol grubu örneklerinde IL-17 gen ifadenmesi görülmemiştir.

Çalışma sonunda; St. 3.02×10^3 < St. 3.55×10^3 sonucu elde edilmiştir.

Candida infeksiyonu sırasında sitokinlerin tam olarak belirlenebilmesi, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda bu infeksiyonlardan korunmada ve tedavide yeni yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

7. ÖZET

KANDİDOZLU SIÇAN BÖBREK DOKULARINDA IL-17 GEN İFADELENMESİNİN GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE GÖSTERİLMESİ

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin daha yaygın kullanımı, organ nakillerinin çok 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. İnfekte sıçan böbrek dokularında IL-17 sitokin ifadenmesi gerçek zamanlı PZR yöntemi ile belirlenmiştir.

İnfeksiyon modeli, sıçanlara verilen *C.albicans* ATCC 10231 referans suşu ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kontrol grubu oluşturularak infekte grup ile karşılaştırılma yapılmıştır. Hayvanlardan alınan böbrek dokularından yapılan kültür pozitif bulunmuştur. Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile çalışılarak böbrek dokularında kandidoz oluşumu gösterilmiştir. Mantara özgül primerler kullanılarak infeksiyon varlığı doğrulanmıştır.

Kandidemi grubunda PZR çalışması sonucunda IL-17 gen ifadelenmesi 12 örneğin 10' unda (%83.3) bulunmuştur. Kontrol grubundaki örneklerin hiçbirinde IL-17 ifadelenmesi görülmemiştir.

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.

Anahtar Sözcükler: *Candida*, sitokin, IL-17, Gerçek zamanlı PZR

8. SUMMARY

DEMONSTRATING THE EXPRESSION OF IL-17 GENE IN RAT CANDIDIASIS KIDNEY TISSUE BY MEANS OF REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

More widespread use of broad-spectrum antibiotics, organ transplants are much more frequent causes, such as suppressed immune systems of patients and such patients increases everyday to show the presence Candidiasis.

In which immunity against *Candida* infections are many factors play a role. Cytokines are one of them. In our study, immunological factors that occur during Candidiasis the determination of different cytokine profiles which is intended. IL-17 cytokine expression in kidney tissues of infected rats to Real-Time PCR assay was determined.

Infection model with was carried out 10231 ATCC reference strains of *C.albicans* given to rats. In addition, a control group was formed in order to compare with infected group. Culture that was made from kidney tissue taken from animals was found positive. Candidiasis formation on kidney tissues is shown by working with Real-Time PCR assay. The presence of fungus infection was confirmed by using specific primers.

As a result of PCR studies Candidiasis group IL-17, ten out of twelve examples (83.3%) were found positive. None of samples in the control group was found positive.

Accordingly, during Candidiasis immune cells play an important role in the relationship of cytokines. Fully determination of effective cytokine profile is intended to allow new development means of protection and treatment of *Candida* infections.

Key words: *Candida*, cytokines, IL-17, Real-Time PCR

9. KAYNAKLAR

1. Edwards JE. *Candida* Species. In: Mandell GL, Bennett J.E, Dolin R, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th edition. New York: Churchill Livingstone; 1995.p.2289-2305.

2. Tümbay E. *Candida* Türleri. İçinde: Ustaçelebi S, editörler. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999.s.1081-1086.

3. Bilgehan H. *Candida*’ ların Tarihçesi, Ekolojisi, Dağılımı. İçinde Tümbay E, editör. *Candida* ve İnfeksiyonları. Türk Mikro. Cem yayınları Bilgehan basımevi; 1986.s.1-8.

4. Prescott LM, Harley JP, Klein DA, editors. Microbiology. Fourth edition. Singapore: McGraw-Hill Companies; 1999.s.818-820.

5. İmir T. İmmunoloji. İçinde: Ustaçelebi S, editörler. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999.s.119-166.

6. Barnett AJ. A History of Research on Yeasts 12: Medical Yeasts Part 1, *Candida albicans*. Yeast 2008; 25: 385–417.

7. John E, Edwards JR. *Candida* species. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles

and Practise of Infectious Diseases. 5th edition. Pennsylvania: Churchill Livingstone; 2000.p. 2656-2674.

8. Yücel A, Kantarcioğlu S. *Candida albicans'* in Taksonomisinde Önemli Bazı Değişiklikler. Cerrahpaşa Tıp Derg 1999; 30 (3): 236-246.

9. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zienkernagel RM. Tıbbi Mikrobiyoloji. Küçüker M, Tümbay E, Anğ Ö, Erturan Z. (Çev) 9. Basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.s.352-356

10. Aydın M. *Candida* Cinsi Mantarlar (*C. albicans*). İçinde: Cengiz T, Mısırlıgil A, Aydın M, editörler. Tıp ve Diş Hekimliğinde Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Yayınevi; 2004.s.1109-1118.

11. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. *Candida*. In: Anaissie EJ, editors. Clinical Mycology. New York: Churchill Livingstone; 2003.p.195-239.

12. Vazquez JA, Sobel JD. Candidiasis. In: Dismukes WE, editors. Clinical Mycology. Oxford: Oxford University Press; 2003.p.143-187.

13. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Medical Mycology. Philadelphia: Lea and Febinger; 1992.p.280-336.

14. Romani L. Overview of The Fungal Pathogens. In: Kauffmann HE, Sher A, Ahmed R, editors. Immunology of Infectious Diseases. Washington: ASM Press; 2003.p. 25-37.

15. Larone DH. Medically Important Fungi: A Guide to Identification. Washington: ASM Press; 2002.p.52-53.

16. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HM, Winn WC, editors. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 3rd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1998.p.573-636.

17. Hazen KC, Howell SA. Fungi- *Candida*, *Cryptococcus* and Other Yeast of Medial Importance. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. Eighth edition. Washington: American Society for Microbiology Press; 2003.p.693-1711.

18. Topçu AW, Çerikçioğlu N. *Candida* türleri. İçinde: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2002.p.1797-1808.

19. Yücel A. Bakteri, Parazit ve Funguslara Karşı İmmün Yanıt. İçinde: Ustaçelebi S, editörler. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999.s.267-289.

20. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *Candida'* ların Patojenlik Belirtgenleri. Cerrahpaşa Tıp Derg 2000; 31(3): 172-186.

21. Yiğit N, Benli M, Maya Hücre Duvar Yapısının Dinamikleri, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Derg 2005; 03(03): 11-17.

22. Kuştimur S. *Candida'* da Virulans Faktörler. I. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi. Tutanaklar 1999; 145-150.

23. Arslan U, Fındık D. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida albicans* Türü Maya Mantarlarında Virulans Faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) İn-Vitro Araştırılması. Enfeksiyon Derg 2003; 17(4): 471-481.

24. Cengiz SA, Us E, Cengiz AT, Slime Faktörünün Klinikteki Yeri Ve Önemi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg 2006; 13(3): 193-197.

25. Uludağ AH, Şener B. Biyofilm Enfeksiyonları ve Antibiyotik Direnci. Derleme. Hacettepe Tıp Derg 2008; 39: 82-88.

26. Yakupoğulları Y, Toraman AZ, Çeşitli Klinik Örneklerden Soyutlanan *Candida* Kökenlerinde Slime Faktörü Üretiminin Araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004; 34: 178-181.

27. Herring AC, Huffnagle GB. Innate Immunity and Fungal Infections. In: Kauffmann H.E, Sher A, Ahmed R, editors. Immunology of infectious diseases. Washington: ASM Press; 2003.p.127-137.

28. Ghannuoum MA, Elteen KH. Pathogenity Determinants of *Candida*. Mycoses 1990;33: 265-282.

29. Kurokawa CS, Sugizaki MF, Peracoli MT. Virulence Factors In Fungi of Systemic Mycoses. Rev Inst Med Trop 1998; 40(3): 125-135.

30. Romani L. Innate and Adaptive Immunity in *Candida albicans* Infections and Saprophytism. J. Leukoc. Biol 2000; 68: 175-179.

31. Kaçmaz B, Sipahi B A, Aksoy A. *Candida* Türlerinin Tanımlanmasında “API ID 32C” ve “Rapid Yeast Plus” Sistemlerinin Karşılaştırılması. ANKEM Derg 2006; 20(4): 214-216.

32. Akalın H. Kandidemilerde Risk Faktörleri ve Risk Değerlendirilmesi. ANKEM Derg 2008; 22(Ek 2): 270-274.

33. Özbal Y. Temel İmmünoloji. 2. baskı, İstanbul: Nobel tıp kitabevleri; 2000.

34. Abbas AK, Lichtman AH. editors. Cellular and Molecular Immunology, 5 th ed. Philadelphia: Saunders, 2003.

35. Oral HB. Mantarlara Karşı İmmün Yanıt. Klimik Derg 2003; 16(1): 62-64.

36. Aytekin A, Peksarı Y. Candidal Enfeksiyonların İmmünolojisi. T Klin Dermatoloji 2002; 12: 229-236.

37. Kılıçturgay K. İmmünoloji. 3 baskı. Bursa: Nobel&Güneş yayınevi; 2003.

38. Casadevall A. Acquired Immunity Against Fungi. In: Kauffmann HE, Sher A, Ahmed R, editors. Immunology of Infectious Disease, Washington: ASM Press; 2003.p.223-234.

39. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. 4.baskı. London: Mosby; 1996.p.17-12.

40. Mencacci A, Cenci E, Bacci A, Montagnoli C, Bistoni F, Romani L. Cytokines in Candidiasis and Aspergillosis. Current Pharmaceutical Biotechnology 2000; 1: 235-251.

41. Vazquez -Torres A, Balish E. Macrophages in Resistance to Candidiasis. Microbiology And Molecular Biology Reviews 1997; 61(2): 170-192.

42. Hayden RT. İn Vitro Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri. İçinde: Persing DH, Tenover FC, Versalović J, Tang Y, Unger

ER, Relman DA, editors. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. 1. baskı. Ankara: Palme Yayınevi; 2006.p.43-69

43. Mullick A, Leon Z, Min-Oo G, Berghout J, Lo R, Daniels R, et. al. Cardiac Failure in C5-Deficient A/J Mice after *Candida albicans* Infection. Infection And Immun 2006; 74(8): 4439-4451.

44. Murciano C, Villamo'n E, O'Connor J, Gozalbo D, Gil ML. Killed *Candida albicans* Yeasts and Hyphae Inhibit Gamma Interferon Release by Murine Natural Killer Cells. Infection And Immun 2006; 74(2): 1403-1406.

45. Zhu J, Paul EW. CD4 T Cells: fates, function and faults Blood 2008; 112(5): 1557-1569.

46. Park H, Li Z, Yang XO, et al. A Distinct Lineage of CD4 T Cells Regulates Tissue Inflammation By Producing Interleukin 17. Nat Immunol 2005; 6: 1133-1141.

47. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4 Effector T cells Develop Via a Lineage Distinct From The T Helper Type 1 and 2 Lineages. Nat Immunol 2005; 6: 1123-1132.

48. Güner İ, Özmen D, Bayındır O. Cytokins. Türkiye Klinikleri J Med Sci 1997; 17: 65-74.

49. Bilgehan H, Temel Mikrobiyoloji ve Başışıklık Bilimi. 10.baskı. İzmir: Barış yayınları; 2002.

50. Romani L. Immunity to *Candida albicans*: Th1,Th2 Cells and Beyond. Current Opinion in Microbiology 1999; 2: 363-367.

51. Curtis MM, and Sing Sing W. Interleukin-17 in Host Defence Against Bacterial, Mycobacterial and Fungal Pathogens Immunology 2009; 126(2): 177-185.

52. Matsuki G, Umemura M, Interleukin-17 as an Effector Molecule of Innate and Acquired Immunity Against Infections, Microbiol. Immunol 2007; 51(12): 1139-1147.

53. Zelante T, De Luca A, Fallarino F, Puccetti P. IL-17 and Therapeutic Kynurenines in Pathogenic Inflammation to Fungi. J Immunol 2008; 180: 5157-5162.

54. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y. TGF-beta and IL-6 Drive The Production of IL-17 and IL-10 by T Cells and Restrain T(H)-17 Cell Mediated Pathology. Nat Immunol. 2007; 8: 1390-1397.

55. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR. Development, Cytokine Profile and Function of Human Interleukin 17-Producing Helper T Cells. Nat Immunol 2007; 8: 950-957.

56. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C. IL-21 and TGF-beta are Required for Differentiation of Human T(H)17 cells. Nature 2008;p.07021.

57. Romagnani S. Human Th17 cells. Arthritis Research & Therapy 2008; 10: 206.

58. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and Functional Features of Human Th17 Cells J Exp Med 2007; 204(8): 1849–1861.

59. Dong C. Th17 Cells in Development: An Updated View of Their Molecular Identity and Genetic Programming. Nat Rev. Immunol 2008; 8(5): 337-48.

60. Jin D, Zhang L, Zheng J, Zhao Y. The Inflammatory Th 17 Subset In Immunity Against Self and Non-Self Antigens. 2008; 41(2): 154–16.

61. Yeğenoğlu Y. İnvaziv Mantar Hastalıklarının Mikolojik Tanısı. İst Tıp Fak Derg 2007; 70: 23-28.

62. Kurtaran B. Yüzeyel Mantar Enfeksiyonları. Çukurova Tıp Derg 2007; 16: 94.

63. Polat S. Sık Görülen Mikozlarda Serolojik Tanı. İnfeksiyon Derg 2007; 21: 063-067.

64. Ellepola ANB, Morrison JC. Laboratory Diagnosis Of Invasive Candidiasis. The J Microbiol 2005; 43: 65-84.

65. Odds FC, Bernaerts R. Chromagar *Candida*, A New Differential Isolation Medium For Presumptive Identification Of Clinically Important *Candida* Species. J. Clin. Microbiol 1994; 32(8): 1923-1929.

66. Ponton J, Moragues MD, Quindos G. Non-Culture-Based Diagnostics. In: Calderone RA, Editors. *Candida* and Candidiasis, 1st ed. Philadelphia: ASM Press; 2002.p.395-441.

67. Luo G, Mitchell TG. Rapid Identification of Pathogenic Fungi Directly From Cultures By Using Multiplex PZR. J Clin Microbiol 2002; 40(8): 2860-2865.

68. Miyakawa Y, Mabuchi T, Kagaya K, Fukazawal Y. Isolation and Characterization of a Species-Specific DNA Fragment for Detection of *Candida albicans* by Polymerase Chain Reaction. J Clin Microbiol 1993; 30(4) : 894-900.

69. Arı Ş. DNA' nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması. İçinde: Temizkan G, Arda N, editörler. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 2.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004.s.101-120.

70. MiyakawaY, Mabuchi T, Kagaya K, Fukazawal Y. Isolation and Characterization of Species-Spesific DNA Fragment for

Detection of *Candida albicans* by Polymerase Chain Reaction. J Clin Microbiol 1993; 30(4): 894-900.

71. Köksal F. Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri. İçinde: Durmaz R, editör. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2. Baskı. Malatya: Nobel Kitabevi; 2001.s.15-34.

72. Atkins SD, Clark IM. Fungal Molecular Diagnostics: A Mini Review. J Appl Genet 2004; 45(1): 3-15.

73. Pietro P, Hussell T, Openshaw J.M. Flow Cytometric Measurement of Intracellular Cytokines. J Immun Meth 2000; 243: 107-124.

74. Brandt ME, Warnock DW. Laboratory Aspects of Medical Mycology. In: Dismuskes WE, Pappas PG, Sobel JD, editors. Clinical Mycology. UK: Oxford University Pres; 2003.p.1-22.

75. Alexander BD. Diagnosis of Fungal Infection: New Technologies for The Mycology Laboratory. Transplant Infect Dis 2002; 4(3): 32-37.

76. Çırak M. Y, Kalkancı A, Kuştimur S. Use of Molecular Methods in Identification of *Candida* Species and Evaluation of Fluconazole Resistance. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98: 1027-1032.

77. Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR Assay for Detection of Fungal Infection in Human Blood Specimens. J Clin Microbiol 1998; 36(5): 1169-1175.

78. Beggs KT, Holmes AR, Cannon RD, Rich AM. Detection of *Candida albicans* mRNA In Archival Histopathology Samples By Reverse Transcription-PCR. J Clin Microbiol 2004; 42(5): 2275-2278.

79. Okeke CN, Tsuboi R, Ogawa H. Quantification of *Candida albicans* Actin mRNA By The Lightcycler System As A Means of Assessing Viability In A Model Of Cutaneous Candidiasis. J Clin Microbiol 2001; 39(10): 3491-3494.

80. Villar CC, Kashleva H, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Invasive Phenotype of *Candida albicans* Affects the Host Proinflammatory Response to Infection. Infect and Immun 2005; 73: 4588–4595.

81. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei X, et al. IL-6 is an Antiinflammatory Cytokine Required for Controlling Local Systemic Acute Inflammatory Responses. J Clin Invest 1998; 311-320

82. Steinshamn S, Waage A. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-6 in *Candida albicans* Infection in Normal and Granulocytopenic Mice. Infect and Immun 1992; 60(10): 4003-4008.

83. Louie A, Baltch AL, Smith RP, Franke MA, Ritz WJ, Singh JK, et al. Tumor Necrosis Factor Alpha Has A Protective Role In A

Murine Model Of Systemic Candidiasis. Infect And Immun 1994; 62(7): 2761-2772.

84. Riipi L, Carlson E. Tumor Necrosis Factor (TNF) Is Induced In Mice By *Candida albicans*: Role of TNF In Fibrinogen Increase. Infect and Immun 1990; 58(9): 2750-2754.

85. Gaforio JJ, Ortega E, Algarra I, Serrano MJ, Cienfuegos GA. NK Cells Mediate Increase of Phagocytic Activity but Not of Proinflammatory Cytokine (Interleukin-6 [IL-6], Tumor Necrosis Factor Alpha and IL-12) Production Elicited in Splenic Macrophages by Tilorone Treatment of Mice during Acute Systemic Candidiasis. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9(6): 1282-1294.

86. Kubota Y, Iwasaki Y, Harada H, Yokomura I, Ueda M, Hashimoto S, et al. Role of Alveolar Macrophages in *Candida*-Induced Acute Lung Injury. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8(6): 1258-1262.

87. Steele C, Fidel PL. Cytokine and Chemokine Production by Humn Oral and Vaginal Epithelial Cells in Response to *Candida albicans*. Infect and Immun 2002; 70(2): 577-583.

88. Kalkancı A. Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α) ve Platelet Aktivatör Faktör (PAF) etkileşiminin Kandidozdaki Rolünün Farede Gösterilmesi. Doktora. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2000.

89. Romani L, Mencacci A, Grohmann U, Mocci S, Mosci P, Puccetti P, Bistoni F. Neutralizing Antibody to Interleukin 4 Induces

Systemic Protection and T Helper Type 1- associated Immunity in Murine Candidiasis J Exp Med 1992; 176: 19-25.

90. Fratti RA, Ghannoum MA, Edwards JE, Filler SG. Gamma Interferon Protects Endothelial Cells from Damage by *Candida albicans* by Inhibiting Endothelial Cell Phagocytosis. Infect and Immun 1996; 64(11): 4714-4718.

91. Lavigne LM, Schopf RL, Chung CL, Maylor R, Sypek JP. The Role of Recombinant Murine IL-12 and IFN- γ in the Pathogenesis of a Murine Systemic *Candida albicans* Infection. J Immunol 1998; 160: 284-292.

92. Roilides E, Anastasiou-Katsiardani A, Dimitriadou-Georgiadou A, Kadiltsoglou I, Tsaparidou S, Panteliadis C, et al. Suppressive Effects of Interleukin-10 on Human Mononuclear Phagocyte Function *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. JID 1998; 178: 1734-1742.

93. Levitz SM, Tabuni A, Nong S, Golenbock DT. Effects of Interleukin-10 on Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Responses to *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and Lipopolysaccharide. Infect And Immun 1996; 64(3): 945-951.

94. Schaller M, Boeld U, Oberbauer S, Hamm G, Hube B, Korting HC. Polymorphonuclear Leukocytes (PMNS) Induce Protective Th1-Type Cytokine Epithelial Responses In An In Vitro Model Of Oral Candidiasis. Microbiol 2004; 150: 2807-2813.

95. Brieland J, Essig D, Jackson G, Frank D, Loebenberg D, Menzel F, Arnold B, Didomenico B, Hare R. Comparison of Pathogenesis and Host Immune Responses to *Candida glabrata* ve *Candida albicans* in Systemically Infected Immunocompetent Mice. Infect And Immun 2001; 69(8): 5046-5055.

96. Badiie P, Kordbacheh P, Alborzi A, Malekhoseini S, Zeini F, Mirhendi H, Mahmoodi M. Prospective Screening in Liver Transplant Recipients by Panfungal PZR-ELISA for Early Diagnosis of Invasive Fungal Infections. Liver Transpl 2007; 13(7): 1011-6.

97. Valdez JC, Mesón DE, Sirena A, de Petrino SF, Eugenia M, de Jorrat BB, de Valdex MG. Induction of The Immune Response Suppression In Mice Inoculated with *Candida albicans*. Mycopathologia. 1986; 93(3): 147-50.

98. Van't Wout JW, Van der Meer JW, Barza M, Dinarello CA. Protection of Neutropenic Mice from Lethal *Candida albicans* Infection by Recombinant Interleukin 1. Eur J Immun 1988;18(7): 1143-1146.

99. Elahi S, Pang G, Clancy R, Ashman R. Cellular and Cytokine Correlates of Mucosal Protection in Murine Model of Oral Candidiasis. Infect and Immun 2000; 68(10): 5771-5777.

100. Spellberg B, Johnston D, Phan Q, Edwards J, French S. Parenchymal Organ, and Not Splenic, Immunity Correlates with Host Survival during Disseminated Candidiasis. Infect and Immun 2003; 71(10): 5756-5764.

101. Stuyt LJR, Netea GM, Verschueren I, Fantuzzi G, Dinarello AC, Van der Meer MWJ et. al. Role of Interleukin-18 in Host Defense Against Disseminated *Candida albicans* Infection. Infect and Immun 2002; 70(6): 3284-3286.

102. Zhou M, Yang B, Ma R, Wu C. Memory Th-17 Cells Specific for *C. albicans* are Persistent in Human Peripheral Blood. Immunology Letters; 2008; 118: 72–81.

103. Huang W, Na L, Fidel LP, Schwarzenberger P. Requirement of Interleukin-17A for Systemic Anti-*Candida albicans* Host Defense in Mice. JID 2004; 190: 624–631.

104. 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.

105. 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: 2640–2645.

106. ZelanteT, 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.

107. Chen Z, Tato MC, Muul L, Laurence A, O'Shea JJ. Distinct Regulation of IL-17 in Human Helper T Lymphocytes. *Arthritis Rheum* 2007; 56(9): 2936–2946.

108. Rowan GA, Fletcher M. J, Ryan JE, Moran B, Hegarty EJ, O'Farrelly C, Mills GHK. Hepatitis C Virus-Specific Th17 Cells are Suppressed by Virus-Induced TGF- β . *J Immunol* 2008; 0022-176.

109. Ge J, Wang K, MENG Q, Qi Z, Meng F, Fan Y. Implication of Th17 and Th1 Cells in Patients with Chronic Active Hepatitis B. *J Clin Immunol*. 2009.s.10875-009-9328-2.

110. Zhang J, Zhang Z, Lin F, Zou Z, Xu R, Jin L et al. Interleukin-7-Producing CD4⁺ T Cells Increase with Severity of Liver Damage in Patients with Chronic Hepatitis B. *Hepatology* 2009; 5: 000-000.

10. EKLER

Yüksek lisans eğitimim boyunca katkıları bulunan başta Ana Bilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Semra Kuştimur'a, danışmanım Sayın Doç. Dr. Işıl Fidan'a ve diğer hocalarıma; tez çalışmamda çok büyük emeği olan, her konuda desteğini gördüğüm Sayın Doç. Dr. Ayşe Kalkancı'ya, her koşulda arkamda olduklarını hissettiren, ellerinden geleni hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşlarıma ve hayat yolculuğumda maddi ve manevi açıdan her zaman yanımda olan sevgili babam Mustafa Usta'ya, sevgili annem Sevgi Usta'ya ve sevgili abim Erdal Usta'ya çok teşekkür ederim.

11. ÖZGEÇMİŞ

Ad: Seda

Soyad: Usta

Doğum Yeri ve Tarihi: Bursa- 19.07.1985

Eğitim:

2008-2009 Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

2003-2007 Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

1999-2003 Bursa Şükrü Şankaya Anadolu Lisesi

Yabancı Dil: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti

Bilimsel Etkinlikleri: 2.'lik poster ödülü. Pulmoner Aspergilloz Sıçan Modelinde IL-17 Sitokin İfadelenmesinin İncelenmesi (14. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, ANTALYA)