

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

**KANDİDOZLU FARE MODELİNDE IFN- γ ,
TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10
SALINIMININ ENZİME BAĞLI
İMMUNOSORBENT YÖNTEM (ELISA) İLE
GÖSTERİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Berna ERDAL

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Turgut İMİR

ANKARA
Ağustos 2007

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince katkıları bulunan başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Nedim Sultan, danışmanım Sayın Prof. Dr. Turgut İmir'e ve diğer hocalarımıza; eğitimim boyunca, her konuda desteğini gördüğüm Sayın Yrd. Doç. Dr. Işıl Fidan'a; her zaman yanımda olan arkadaşım Bio. Emine Yeşilyurt'a ve Sevgili aileme teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Taksonomi	3
2.3. Ekoloji	4
2.4. Mikrobiyolojik Özellikler	5
2.4.1. Morfoloji	5
2.4.2. Hücre Yapısı	6
2.4.2.a. Kapsül	6
2.4.2.b. Hücre Duvarı	7
2.4.2.c. Hücre Zarı	8
2.4.2.d. Sitoplazma	8
2.5. Virulans ve Patojenite	9
2.5.1. Yapışma (Adezyon)	10
2.5.2. Çimlenme Borusu	10
2.5.3. Dimorfizm	11
2.5.4. Toksinler	12
2.5.5. Enzimler	12
2.5.6. Slime Faktörü (Biyofilm)	13
2.6. İmmünopatogenez	14
2.6.1. Sitokinler	18

2.6.1.a. İnterlökin-1 (IL-1)	20
2.6.1.b. İnterlökin-2 (IL-2)	20
2.6.1.c. İnterlökin-4 (IL-4)	21
2.6.1.d. İnterlökin-6 (IL-6)	21
2.6.1.e. İnterlökin-10 (IL-10)	22
2.6.1.f. İnterferon gama (IFN- γ)	22
2.6.1.g. Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α)	23
2.7. Kandidozda Bağışıklık	23
2.8. Kandidozda Tanı	27
2.8.1. Enzime Bağlı İmmünosorbent Test (ELISA)	29
2.8.1.a. ELISA Yönteminin Uygulanması	34
2.8.1.b. ELISA ile Antijen Tespiti	35
2.8.1.b.1. Yarışmasız Yöntem	35
2.8.1.b.2. Yarışmalı Yöntem	36
2.8.1.c. ELISA ile Antikor Tespiti	36
2.8.1.d. ELISA Yönteminde Sonuçların Değerlendirilmesi	37
3. GEREÇLER	39
3.1. Cihazlar	39
3.2. Kimyasal Maddeler	40
3.3. Diğerleri	41
4. YÖNTEMLER	42
4.1. Suşlar	42
4.2. Hayvan Modeli	42
4.3. Besiyerinin Hazırlanması	43
4.4. Dalaktan Hücre İzolasyonu	43
4.4.1. Eritrosit Lizis Aşaması	43
4.4.2. Hücrelerin Elde Edilmesi	44
4.5. LPS Hazırlanması	45
4.6. Hücre Kültürü	45

4.7. ELISA	46
4.8. Kontaminasyona Karşı Koruma	47
4.9. İstatistiksel Analiz	47
5. BULGULAR	48
5.1. Sitokinlerin salınımının ELISA Sonuçları	48
5.1.1. TNF- α Salınımının Gösterilmesi	48
5.1.2. IL-1 β Salınımının Gösterilmesi	49
5.1.3. IL-6 Salınımının Gösterilmesi	50
5.1.4. IL-2 Salınımının Gösterilmesi	51
5.1.5. IL-4 Salınımının Gösterilmesi	52
5.1.6. IFN- γ Salınımının Gösterilmesi	53
5.1.7. IL-10 Salınımının Gösterilmesi	54
6. TARTIŞMA	55
7. SONUÇ	70
8. ÖZET	71
9. SUMMARY	73
10. KAYNAKLAR	75
11. ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİLLER

Şekil 1: <i>Candida albicans</i> ' ın Maya ve Hif Görünümü	6
Şekil 2: Doğal ve Kazanılmış Bağışıklık Sistemi Elemanları	15
Şekil 3: Bağışıklık Sisteminde Sitokin Döngüsü	19
Şekil 4: ELISA Yöntemi	30
Şekil 5: Kompetitif, İndrek ve Direk ELISA Yöntemleri	32
Şekil 6: Besiyerinde <i>Candida albicans</i> ' ın Görünümü	42

GRAFİKLER

Grafik 1: <i>Candida albicans</i> ile infekte ve infekte olmayan fare mononükleer hücrelerinde TNF- α salgılanması	48
Grafik 2: <i>Candida albicans</i> ile infekte ve infekte olmayan fare mononükleer hücrelerinde IL-1 β sekresyonu	49
Grafik 3: <i>Candida albicans</i> ile infekte ve infekte olmayan fare mononükleer hücrelerinde IL-6 salgılanması	50

Grafik 4: <i>Candida albicans</i> ile infekte ve infekte olmayan fare mononükleer hücrelerinde IL-2 salgılanması	51
Grafik 5: <i>Candida albicans</i> ile infekte ve infekte olmayan fare mononükleer hücrelerinde IL-4 salgılanması	52
Grafik 6: <i>Candida albicans</i> ile infekte ve infekte olmayan fare mononükleer hücrelerinde IFN- γ salgılanması	53
Grafik 7: <i>Candida albicans</i> ile infekte ve infekte olmayan fare mononükleer hücrelerinde IL-10 salgılanması	54

1. GİRİŞ

Antibiyotiklerin yaygın olarak kullanımı, organ nakillerinin çok sık yapılması ve bu tür hastalarda bağışıklık sistemini baskılayıcı ajanların kullanımının artışı gibi nedenlerle mantar infeksiyonlarında son yıllarda büyük bir artış görülmektedir ¹.

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

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

Candida infeksiyonlarına karşı korunmada doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemi önemlidir. Bu sistemlerde yer alan hücresel ve humoral mekanizmalar kandidoza karşı korunmada birlikte çalışır. Mekanik bariyerler, fagositik hücreler, T hücreleri ve antikor üretimi *Candida* infeksiyonlarına karşı savunmanın farklı basamaklarında değişik etkinlikte rol almaktadır ^{2,3,4,5,6}.

Hücreler arası ilişkiler bir yandan iki hücrenin doğrudan doğruya birbirleri ile ilişki kurmaları, bir yandan da oluşturdukları hormon benzeri maddelerle birbirlerini etkilemeleri sonucunda yürütülür. Bağışık yanıtın düzenlenmesinde, B ve T lenfositleri, makrofajlar, monositler gibi bağışıklık sistemi hücreleri tarafından salınan hormon benzeri aracı maddelere genel olarak "sitokinler" adı verilir. Peptit ya da glikoprotein yapısında olan sitokinler, bağışık yanıt olaylarında, yangısal tepkimelerde,

doku onarımında, bağışıklık sistemi hücrelerinin çoğalıp farklılaşmasında görev alır ^{2,7,8}.

Son yıllarda sitokinlerin gösterilmesi için serolojik yöntemler yanında moleküler yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde birçok tanı laboratuvarlarında yaygın olarak ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) testleri kullanılmaktadır. Bu testlerin avantajları arasında geniş infeksiyon tanı parametrelerinin ticari olarak temin edilmesi, yöntemin otomasyona uyarlanabilirliği ve böylece çok sayıda örneğin kısa sürede çalışılabilmesi, sonuçların spektrofotometrede objektif olarak -kalitatif, semikantitatif ya da kantitatif- değerlendirilmesi gibi özellikler sayılabilir ^{3,5,8}.

Bu çalışmada, invaziv kandidoz oluşturulmuş fare modelinde İnterlökin 1 β (IL-1 β), İnterferon γ (IFN- γ), Tümör Nekroz Faktör α (TNF- α), İnterlökin 2 (IL-2), İnterlökin 4 (IL-4), İnterlökin 6 (IL-6), İnterlökin 10 (IL-10) gibi sitokinlerin salınımının araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Tarihçe

M.Ö. 4. yüzyılda Hippocrates ve Galen'in oral lezyon olarak tanımladıkları pamukçuğun altta yatan ciddi hastalıklar ile ilişkili klinik bir belirti olduğu bilinmekteydi. 1839'da Almanya'da Bernard Langenbeck, tifüslü bir hastanın oral lezyonlarından izole ettiği organizmayı "Typhus-Leichen" (tifüs cisimcikleri) olarak tanımlamış, 1841'de Emil Berg tarafından sağlıklı bebeklerde pamukçuğun fungal etyolojisi araştırılmıştır. *Candida albicans* ilk kez 1842'de Gruby tarafından tanımlanmıştır^{9,10}.

2. 2. Taksonomi

Candida cinsi 200'ün üzerinde tür içermektedir. Bu türlerden bazıları insanlarda hastalık yapmaktadır (Odds,1988). Bunların içinde *Candida albicans* (eş anlamlı kelimeler: *Oidium albicans*, Robin, 1853; *Monilia albicans*, Zopf,1890; *Endomyces albicans*, Vuillemin,1898) en önemli mantar patojeni olarak yer alır ve yaygın mukozal ve sistemik mantar infeksiyonlarına neden olur. Klinik açıdan önemli diğer *Candida* türleri: *Candida glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. stellatoidea* ve *C. dubliniensis*'dir^{11,12,13}.

Candida; *Mycetae* aleminin *Amastigomycota* bölümüne, *Deuteromycetes* sınıfına, *Blastomyces* alt sınıfına ait *Cryptococcaceae* ailesinin *Candida* cinsinde sınıflandırılmıştır^{11,12,13}.

2. 3. Ekoloji

Candida türleri normalde deri ve mukoza florasında bulunan organizmalardır. Normal bireylerin ağız ve sindirim kanalında bulunur. Doğumdan kısa bir süre sonra yeni doğana bulaşarak söz konusu flora içinde yerlerini alırlar. 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 ^{1,9,12,13}.

Diabetes mellitus, hücresel immün yetmezlikler, nötropeni ve AIDS gibi durumlarda kanda bulunan *Candida* uzaklaştırılmaz ve kanda çoğalıp herhangi bir organ veya sisteme yerleşerek infeksiyon odakları oluşturur. En sık tutulan organlar; böbrek, deri, göz, kalp, karaciğer, dalak ve beyin zarlarıdır ^{1,6}.

Sistemik mikozlar içerisinde en sık görülen kandidozdur. Kandidozlar; vajinit, onikomikoz, intertrigo, perianal kandidozu, generalize deri kandidozu, pulmoner kandidoz, bronkopulmoner kandidoz, sistemik kandidoz olarak sınıflandırılır ^{1,6,9}.

2. 4. Mikrobiyolojik Özellikleri

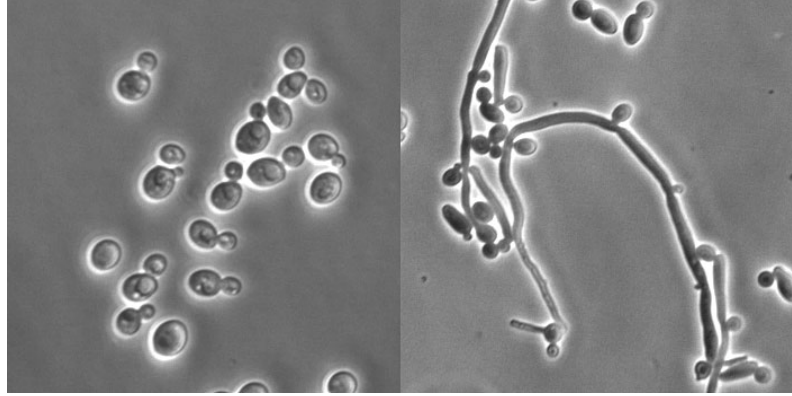
2. 4. 1. Morfolojisi

Klinik örneklerde ve kültürlerde *Candida* türleri 4-6 µm büyüklüğünde, oval veya yuvarlağımsı, tomurcuklanan hücreler (blastosporlar) olarak görülür. Ayrıca yalancı hif de oluşturabilir. *Candida* türleri arasında *C. albicans* blastospor ve yalancı hif yanında gerçek hifler de oluşturarak dimorfik özellik gösterir ^{1,6,8,9,10}.

Sabouraud-dekstro-agar (SDA), mısır unlu agar, patatesli nişastalı dekstro-agar gibi rutin besiyerlerinde, oda ısısında veya 37°C' de, %10'luk CO₂'li ortamda, pH 2-8'de, 24 saatte üreyerek düzgün, kirli beyaz veya krem rengi, yumuşak kıvamlı ve tipik olarak mayamsı kokulu koloniler oluşturur. Koloniler eskidikçe buruşuk bir görünüm alır. Kültürden alınan koloni materyali Gram(+) boyanır. Koloninin besiyeri üzerinde kalan bölümü blastosporlardan meydana gelir ve besiyeri yüzeyinin altında ise yalancı hifler bulunur ^{1,6,9,10}.

C. albicans glukoz, galaktoz ve maltozu fermente ederken laktoz, rafinoz, melisitoz ve inülini fermente etmez. Glukoz, galaktoz, maltoz, sukroz, trehaloz, D-ksiloz, ve D-mannit'i asimile eder; laktozu, rafinozu ve sellobiyo-azu asimile etmez. Sikloheksidine duyarlıdır. Sukrozdan gaz yapmaz ^{12,13,14}.

C. albicans 'ı diğer *Candida* 'lardan ayıran en önemli özelliği germ tüp deneyinin pozitif olmasıdır. Serum içinde 37°C'de 2 saat inkübe edilirse, çimlenme borusu (germ tüp) oluşumu gözlenir. Ancak *C. stellatoidea* ve *C. dubliniensis* de germ tüpü 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 ^{1,6,9,11,12,13}.



Şekil 1: *Candida albicans*' ın maya ve hif görünümü

2. 4. 2. 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 ^{1,6,8,9,12}.

2. 4. 2. a. Kapsül

Hücre duvarının dışında ince ve elektron geçirmeyen bir dış örtüdür. Kimyasal yapısı, fiziksel özellikleri ve antijenitesi ile türlere göre farklılık gösterir. Polisakkarit yapısındadır. En önemli kapsüllü mantar olan *Cryptococcus neoformans*'ın kapsülü çini mürekkebi ile gösterilir.

Kapsül konak hücreye tutunmayı, bir araya gelip kümeleşmeyi, konağın fagositoz etkisinden kaçmayı sağladığı gibi antijenik özellikte gösterir ^{8,9,12}.

2. 4. 2. b. Hücre Duvarı

Plazma zarı dışına yerleşmiş dinamik bir oluşumdur. Elektron mikroskopunda dış yüzeyi fibriller, iç yüzeyi düz yapıda görülür. Fibriller tabaka konak hücrelere tutunmayı sağlar. Hücre duvarı, sert bir yapıda olup, hücreye şekil verir; hif oluşumunda görev alır; protoplastı osmotik değişikliklere karşı korur; ortam ile maya arasındaki ilişkiyi düzenler ve maya hücresinin değişik yüzeylere tutunmasında doğrudan görev alır^{9,12,15}.

Duvar komponentlerinin %80-90'ı karbonhidratlar, % 5-15'i protein ve %2-5'i lipidlerden oluşur. Karbonhidratların ise %20-30'u mannoprotein, %50-60'ı β -glukanlar ve %0,6-9'u kitin yapısındadır. Polisakkarit olarak mannan, glukan ve kitin içerir. Hücre duvar matriksinin başlıca polisakkaritlerinden olan glukan, β -1,3 dalları içeren β -1,6 D-glukoz rezidülerinden meydana gelir. Ayrıca kitin sentetaz ile sitozolde bulunan kitin, β -1,4 bağları içeren N-asetil-D-glukozaminin dallanmamış polimeridir. Kitinin maya hücresinin tomurcuklanarak bölünmesinde önemli rolü vardır. β -glukan ve kitin sert bir ağ oluşturarak duvarın yapısal bileşenini oluşturur. Proteinler ve glukoproteinler bu iskelete bağlanır. Mannan ise, α -1,6 bağları olan D-mannozdan oluşur^{8,9,12,15}.

C. albicans'ın hücre duvarından türetilen mannanın insan nötrofillerini baskılayıcı, ayrıca mantarın ağız epitel hücrelerine yapışmasını kolaylaştırıcı etkisi bilinmektedir^{9,11,12,13}. Konak hücre zarındaki glikozid reseptörlerle ilişki kurduğu düşünülen mannoprotein fibrillerin üretimindeki artışın yapışmada önemli olduğu bildirilmiştir. Fibrillerin üretimi, mayanın fagositler tarafından hücre içine alınarak öldürülmesine karşı oluşan direnci artırır ve böylece hem kolonizasyonuna yardım eder hem de enfeksiyon potansiyelini artırır^{9,11,12}.

Hücre duvar yapısında bulunan bazı maddeler antifungal ajanlar için hedef oluştururken, bazıları aynı zamanda antijenik determinantları taşır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar *C. albicans* hücre duvarında, ısı şok proteinleri, glikolitik enzimler, laminin, fibronektin bağlayan proteinler, entaktin, vitronektin reseptörü, C3, C3d, C3b gibi kompleman komponentlerine karşı reseptör bulunduğunu ortaya koymuştur^{12,15}.

2. 4. 2. c. 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^{9,11,12,13}.

2. 4. 2. d. Sitoplazma

Maya hücrelerinde etrafında nükleer membran bulunan çekirdek bulunur. Nükleolus RNA (Ribonükleik asit)' dan zengindir. Sitoplazmada golgi cihazı, 80s ribozomu, hidrolitik ve sindirim enzimlerini içeren vakuoller, lipid ve glikojen granülleri, mikrofament ve mikrotübüller bulunur^{1,2,11,12,13,15}.

2. 5. Virulans ve Patojenite

Önceleri *Candida* cinsi içerisinde yalnızca *C. albicans*' ın patojen olduğu düşünülmüş, 1960' lardan sonra klinik deneyim ve çeşitli deney modellerinin sonuçlarına dayanarak yaklaşık 15 *Candida* türünün patojen olduğu kabul edilmiştir. Diğer yandan deneyler, *C. albicans* kökenleri arasında da virulans farklılıklarının varlığını ortaya koymuştur^{11,12}.

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

Altta yatan bir hastalık (lösemi, AIDS vd.), fagositik fonksiyon bozuklukları (granülositopeni, nütropeni vd.), dış etkenler (intravenöz ilaç kullanımı, geniş spektrumlu antibiyotiklerle tedavi, organ nakli, travma vd.) gibi faktörler hastalığın oluşumunu etkiler¹.

Konak bağışıklığını yenmek için birlikte rol oynayan ve patogeneizde önemli yeri olan *Candida* virulans faktörleri: adezyon, çimlenme borusu, dimorfizm, toksinler, enzimler, biyofilm oluşumu şeklinde sıralanabilir .

2. 5. 1. Yapışma (Adezyon)

C. albicans' ı, *Candida* cinsi içerisinde en sık karşılaşılan tür olarak öne çıkaran özelliklerin başında mukoza yüzeylerine yapışma yeteneği gelir. Adezyon, mayanın konak ile ilişkisinde ilk basamağını oluşturur ve hücrelerin yüzey özellikleri ile ilgilidir. *C. albicans* diğer *Candida* türlerine oranla kan damarları, endotel hücreleri, epidermal keratinositler gibi konak hücrelerine daha fazla yapışma yeteneğine sahiptir. Çeşitli yüzeylere bağlanmasını; şekerler, metal iyonları, pH, ısı gibi çevresel faktörlerin yanı sıra fibrinojen, fibronektin, laminin, tip I ve tip IV kollojen gibi konak proteinleri ve maya hücrelerinin morfolojileri, üreme fazları, yüzey özellikleri, diğer mikroorganizmalar ile etkileşimleri belirlemektedir ^{1,11,12}.

Ortamda şeker (galaktoz) veya 2 değerlikli iyonlar (Mg^{++} , Ca^{++}) bulunduğunda mayanın konak hücrelerine tutunması artar. Monosakkarit ve disakkaritler adezyonu artırırken aminoşekerler adezyonu inhibe eder ^{1,9,11}.

C. albicans' da mantarın epitel yüzeylerine yapışmasına katkıda bulunan yüzey proteinlerini kodlayan bir grup gen (ALS gen ailesi) üzerinde de çalışılmaktadır ¹¹.

2. 5. 2. Çimlenme Borusu

İnfekte dokularda *C. albicans'* ın hem maya hem de hif şekli bulunur. Hif şekli aktif semptomlu infeksiyonla ilişkilidir. Çimlenmekte olan hif formuna sahip hücrelerin virulansının fazla olduğu bilinmektedir. Fare deneylerinde çimlenmenin adezyon olayının başlamasını uyardığı fakat eksikliğin invazyonu önlemediği gösterilmiştir ^{1,6,11,14}.

2. 5. 3. Dimorfizm

Candida türleri içerisinde hif üreterek çoğalabildiği bilinen tek tür *C. albicans*' tır. Hif şekli ile infeksiyon arasındaki sebep sonuç ilişkisi; dokuya hifin maya hücrelerine oranla daha kolay yapışmasına, hifin sindirilmesinin daha zor olmasına ve lezyondan kazınan materyalde de *C. albicans* 'ın genelde hifli şekilde gözlemlenmesine bağlanmaktadır ^{1,9,11}.

C. albicans kökenlerinin genelde belirli agar 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 ^{9,11}.

M fazına geçişi indükleyen iki uyarı tespit edilmiştir: 1) Mitojen-active protein kinaz aktivasyonu (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 ^{11,15}.

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 koloniler ve uzun büyük hücreler görülmektedir. Her iki fenotipin hücrelerinin DNA içeriği aynı kalmaktadır. Opak tipin hücreleri beyaz tipin üç katı hacimde olmaktadır. Opak ve beyaz koloni tiplerinin hücreleri arasında hif oluşturma yeteneği, generasyon süresi, düşük ve yüksek sıcaklıklara duyarlılık farklı olmaktadır. Beyaz fenotipten opak fenotipe geçiş daha yüksek, opaktan beyaza değişim ise daha düşük orandadır. Bu sistem *C. albicans* 'ın patogenezinde virulans faktörü olarak mantarın

konağın savunma sistemine karşı koyabilmesinde ve ilaçlara duyarlılığının değişebilmesinde rol oynamaktadır ^{11,15}.

2. 5. 4. Toksinler

C. albicans 'ın toksinleri, yüksek molekül ağırlıklı olanlar ve düşük molekül ağırlıklı olanlar olmak üzere iki grupta toplanır ^{2,9,12}.

a)Yüksek Molekül Ağırlıklı Toksinler: Glikoprotein toksinler ve kandidotoksinlerdir. 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. Kandidotoksin ise virülanslı bir *C. albicans* kökeninden elde edilmiştir ve farelere damar içine enjekte edildiğinde öldürücüdür ^{9,11,12}.

b)Düşük Molekül Ağırlıklı Toksinler: Bu toksinler kandidotoksin üreten *C. albicans* kökeninden elde edilmiştir. Bu toksinler şok uyandırır ve ölümcül etkinlikle yakından ilgilidir ^{11,12}.

2. 5. 5. Enzimler

C. albicans 'ın salgıladığı ve patogenezele ilgisi olduğu düşünülen enzimler iki ana grupta toplanır:

1) Proteinaz: *C. albicans* protein içeren besiyerlerinde geliştiğinde proteinaz salgılar. Yüksek proteolitik etkinliğe sahip *C. albicans* kökenlerinin invivo proteinaz salgılayarak farelerde daha yüksek oranda

ölüm ve kolonileşmeye sebep oldukları bilinmektedir^{16,17}. Proteinaz üretimi ile yapışma ve dokuya yayılma arasında uyum olduğu gösterilmiştir^{5,14}. Dimorfizm ile ilgili olayları düzenleyen birçok hücre dışı salgı asit proteinazı (SAP) gen ifadelenmesi yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. SAP1, SAP2, SAP3 genlerinin yalnızca maya hücrelerinde; SAP4, SAP5, SAP6' nın ise hif hücrelerinde ifadelendiği; SAP1'in *C. albicans*' ın opak fenotipinde; SAP2 ve SAP3' ün ise hem opak hem de beyaz fenotipte ifade edildiği belirtilmiştir^{16,17,18,19}.

Kitinaz ise proteazdır ve hücre duvarında bulunan glukana glikolizidik bağlar ile tutunmuş olan kitini parçalar.

Aspartik proteinazlar ve β -merkaptetanol konak dokuya sızan diğer litik enzimlerdir.

2) Fosfolipazlar ve Lizofosfolipazlar: *C. albicans*' da bulunan fosfolipazların A, B ve C tipinde olduğu bilinmektedir. *C. albicans* kökenlerinin %79'u fosfolipaz üretmektedir. *C. albicans* 'ın ürettiği fosfolipazın iki önemi vardır. Bir taraftan mayanın gelişmesinin kontrolü ve parazit hücre zarının biçimlendirilmesi, diğer yandan da kandidoz lezyonlarında konak dokusuna yayılma ile ilgilidir^{11,16,17,18}.

2. 5. 6. Slime Faktörü (Biyofilm)

Hastane kaynaklı kan dolaşımı ile ilgili infeksiyonların başında Gram(-) bakterilerden sonra mantarlar özellikle de *C. albicans* gelmektedir^{1,11,16}.

C. albicans, bileşiminde karbonhidrat (%41), protein (%5), fosfor ve heksozamin içeren bir ekstraselüler matriks sentezleyerek hücre dışında biriktirir. Bu matriks hidrofobiktir ve konak doku proteinlerine tutunabilir. Bu tutunmayı takiben üzerine serum proteinleri (özellikle fibrin), deskuame epitel hücreleri, ölü lökositler ve yalancı hifler yerleşir. Antifungallere daha

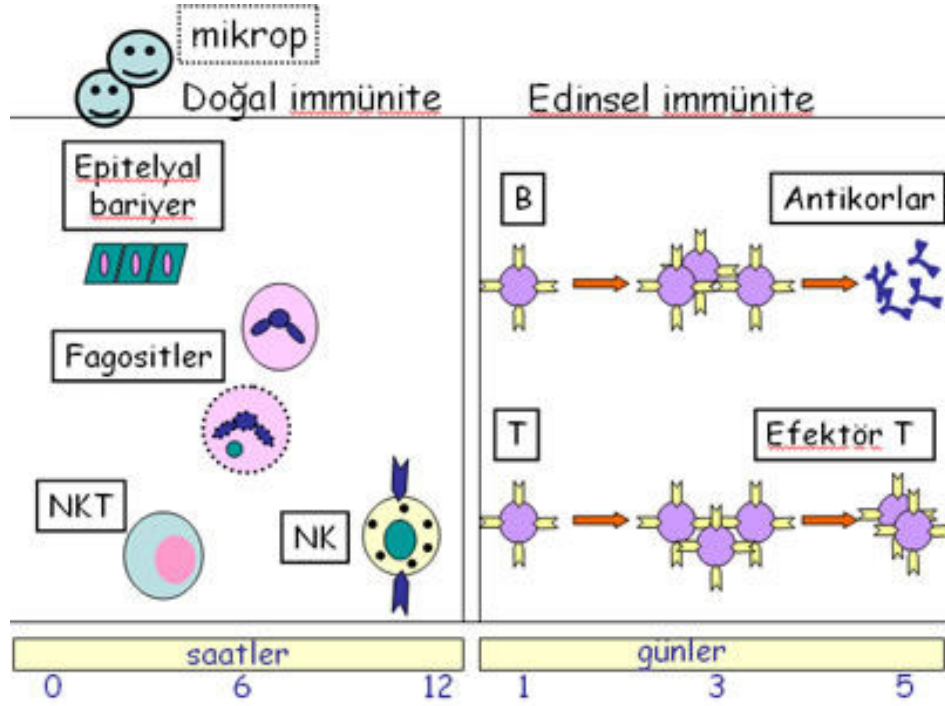
dirençli olan ve mayaların yaşam faaliyetlerini destekleyen kandidiyal elementlerden oluşan, çamursu yapıdaki bu tabakaya “kandidiyal biyofilm” adı verilir. Böyle bir biyofilmde, en alt tabakadaki *C. albicans* hücreleri blastospor geliştirerek altındaki konak dokuya yapışır. Böylece hem dışardan gelebilecek antifungallerden korunur, hem de konak dokuda enfeksiyonu düzenleyecek bir mimari geliştirir ^{1,14}.

2. 6. İmmunopatogenez

Candida fırsatçı bir patojendir. *Candida* ile enfekte hastalarda ortak bulgu bağışıklık sistemindeki bir eksikliğin bulunmasıdır. Özellikle T hücrelerinin işlev dışı kalmaları *Candida* enfeksiyonları için davet edici bir niteliktedir^{2,3,5,6}.

Candida, aynı florada bulunan bakteriler ile belirli bir denge içerisinde yaşar. Bakteri sayı ve çeşitliliğindeki bir azalma ile florada meydana gelen herhangi bir değişim *Candida*’nın ortamda baskın duruma geçmesine sebep olabilir. Buna “bakteriyel diskordans” denir. Uzun süre antibiyotik kullanılması bakteriyel diskordansa sebep olabilir ¹⁴.

Yabancı bir ajanın organizmaya girişini önlemede ilk savunma mekanizması deri, mukus, silyalı epitel, mide asidi ve safra gibi doğal bariyerlerdir. Eğer bu bariyerler bozulur veya ajan başka bir yolla içeri girerse ateş, interferon, kompleman, doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri), nötrofiller, makrofajlar gibi hızlı lokal yanıt oluşturan, antijene spesifik olmayan doğal bağışık yanıt devreye girer. Doğal bağışıklığın yetersiz kaldığı durumlarda ise, antikor ve T hücrelerinin oluşturduğu kazanılmış bağışık yanıt oluşur. *Candida* enfeksiyonlarına karşı gelişen bağışıklık, doğal ve kazanılmış bağışıklık arasındaki karmaşık bir ilişki sonucunda gerçekleşmektedir ^{3,4,7}.



Şekil 2: Doğal ve Kazanılmış Bağışıklık Sistemi Elemanları

Kompleman sistemi, büyük kısmı karaciğerde sentezlenen, kan ve hücre dışı sıvıda bulunan 20'den fazla proteini içeren bir sistemdir. Kompleman, antijen - antikor bileşiğine bağlanarak aktif hale gelir. Bu yolla hücre erimelerine yol açar. Ayrıca değişik yollarda aktive olarak organizmanın savunmasında yer alır ^{3,4}.

Kompleman aktivasyonu, klasik ve alternatif yol olmak üzere iki ana yolla gerçekleşir. Kompleman sisteminin herhangi bir yolla aktivasyonu sonucunda birçok mikroorganizma, membran saldırı kompleksinin etkisiyle lizise uğratılmaktadır. Ancak mantarlarda direk lizis mekanizması, mantar hücre duvarı kalın olduğu için gerçekleştirilemez. Kompleman, opsonin gibi görev yaparak fagositler üzerindeki kompleman reseptörlerine bağlanmayı ve fagositozu kolaylaştırır ^{3,7}.

Bağışık yanıtta yer alan tüm hücrelerin kaynağı kemik iliğidir. Hücreler “hematopoez” olayı ile meydana gelir. Bağışık yanıtta yer alan hücreler:

1)Mononükleer Hücreler: Kanda dolaşan monositler, kapiller endotelindeki makrofajlar, seroza zarlarında bulunan makrofajlar, dalak ve lenf bezi sinüslerinde bulunan dendritik hücreler, beyin dokusundaki mikrogliya hücreleri, böbrek glomerüllerindeki mezengium makrofajları, kemik iliğinin osteoklastları, deri dokusundaki langerhans hücreleri, karaciğer dokusunda kupffer hücrelerinden oluşan sisteme “mononükleer fagositik sistem” ya da “retikuloendotelyal sistem (RES)” adı verilir.

Mononükleer fagositik sistem monositlerden kaynaklanır. Kanda dolaştıktan sonra bu hücreler dokulara yerleşir. Dokuya yerleşince “mononükleer makrofaj” ya da “histiyosit” adını alır. Bu hücreler, fagositoz ve pinositoz yaparak organizmada bulunan ve temizlenmesi gereken mikroorganizmayı, antijen-antikor komplekslerini ve başka maddeleri hücrelerinin içerisine alarak (endositoz ile) ortadan kaldırır⁷.

Monosit/makrofajların lenfositlere antijen sunma görevi de vardır. Bu görevi yapan makrofajlar özellikle derideki “Langerhans hücreleri” ile kan, lenf bezleri, dalakta yerleşmiş olan “dendritik hücreler”dir. Bu hücrelerde MHC Sınıf 2 (Major Histokompatibilite Kompleks) molekülleri bulunur.

2)Lenfositler: İri bir nükleus ve onu çevreleyen dar bir sitoplazmadan oluşan hücrelerdir. Periferik kandaki lenfositlerin %75’i T, %15’i B ve %10’u NK hücreleridir.

Lenfositler, B, T ve NK hücreleri olmak üzere 3 ana gruba ayrılır.

a)B Lenfositler: Esas fonksiyonları antikor üretimidir. Bunun yanı sıra antijenlerle birleşir, onları işler ve T hücrelerine sunabilir. Aktive B hücreleri ya hafıza hücrelerine dönüşür ya da plazma hücrelerine farklılaşır^{7,8}.

b) T Lenfositler: Humoral bağışıklıkta rol alır ve timusta olgunlaşır. Özgül antijenler ile karşılaşan T lenfositleri büyümeye-çoğalmaya başlar ve “lenfokinler” adı verilen moleküller salar. Bu moleküller yabancı dokunun yok edilmesinde görevlidir.

CD4 ve CD8 proteinleri, T lenfositlerin yüzeylerinde bulunan en önemli antijen tanıyan reseptörlerdir. CD4 proteini antijen sunucu hücrelerdeki MHC Sınıf 2 molekülleri ile; CD8 proteini ise antijen sunucu ve hedef hücrelerdeki MHC Sınıf 1 molekülleri ile ilişki kurarak hücre tanınması gerçekleşir.

T lenfositleri ise yardımcı (Th), sitotoksik (Tc), baskılayıcı (Ts) ve bellek T lenfositleri olarak dörde ayrılır.

b. 1.) Sitotoksik T Lenfositleri: Direk olarak kendileri veya salgıladıkları lenfokinler aracılığı ile hücresel immün cevapta etkili lenfositlerdir. Virus, parazit ve bakteri ile infekte hücrelere, tümör hücrelerine ve doku ve organ nakli hücreleri gibi organizmaya zararlı ve yabancı hücrelere doğrudan saldırır. Bu hücrelerin zar bütünlüğünü bozar ve hücreyi lizise uğratar³.

b. 2.) Baskılayıcı T Lenfositleri: Yardımcı T hücrelerinin ve B lenfositlerinin fonksiyonlarını baskılayarak bağışıklık sistemi reaksiyonlarının aşırıya kaçmasına izin vermez^{3,7,8}.

b. 3.) Yardımcı T Lenfositleri: Kandaki lenfositlerin %35-60'ini oluşturur. Görevleri, timusa bağımlı antijenlerin uyarımı karşısında B lenfositlerine yardım ederek onların plazma hücrelerine dönüşmelerini ve bağışıklık sisteminin yanıtı olan antikor sentezlemelerini sağlamak, sitotoksik T lenfositleri ile baskılayıcı T lenfositlerini uyarmaktır^{7,8}.

b. 4.) Bellek T Lenfositleri: Antijen ile daha önceden tanışmış hücrelerdir. İkinci kez karşılaşmada antijeni tanır. Çoğalarak sitotoksik ve yardımcı T lenfositlerinin fonksiyonlarını gerçekleştirirler.

c) Doğal Öldürücü Hücreler (NK Hücreleri): Bu hücreler kemik iliği ve dalakta bulunur. Yüzeylerinde ne immunglobulin ne de antijen reseptörleri bulunmaz. En önemli görevli; tümör hücrelerini ve virus taşıyan hücreleri öldürmektir. Hedef hücrelerdeki MHC antijenlerini tanımaya gerek olmadan tümör hücrelerini öldürür. NK hücreleri, interlökin 2 (IL-2) ve interferon- γ (IFN- γ) gibi bazı sitokinler tarafından aktive edilir.

2. 6. 1. 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 bir grup potent peptid veya glikoprotein yapısındaki solübl madde “sitokin” olarak adlandırılır. Monosit/makrofajlar tarafından salınan sitokinelere “monokin”, lenfositler tarafından salınan sitokinelere “lenfokin”, lökositlere etki eden “monokin” ve lenfokinelere ise “interlökin” denilmektedir ^{3,5}.

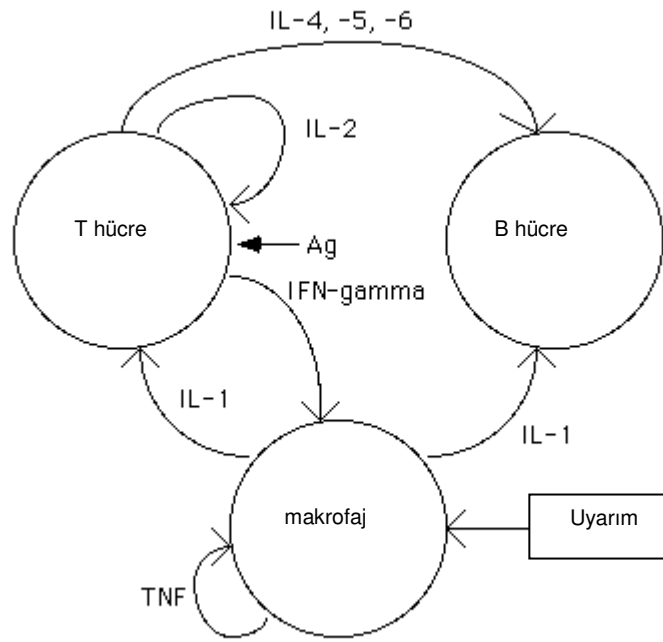
Sitokinler, doğal ve kazanılmış bağışıklıkta rol alan, bağışık ve inflamatuvar olaylara katılan hücrelerin etkinliklerinin artırılmasını sağlayan proteinlerdir. Hücreler arasında mesaj ileten biyolojik yanıt değiştiricilerdir ⁷.

Sitokinler antijen için spesifik değildir. Sentezlenmeleri ve hedef hücreleri etkilemeleri için çoğunlukla bir uyarı gerektirir; kendi aralarında agonist ve antagonist etkileşimler gösterebilir. Sitokin salgılanması kendini sınırlayıcı özelliktedir ^{3,7}.

Lenfositlerin büyüme ve farklılaşmasında, antijenlerin eliminasyonunda, hematopoetik hücrelerin gelişiminde rol alır.

Sitokinlerin etkileri hedef hücrelerdeki spesifik membran reseptörlerine bağlanmaları ile başlar.

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 semptomatolojisi, yüksek dozlarda şok, toksik, hatta öldürücü etkiler oluşturur.



Şekil 3: Bağışıklık sisteminde sitokin döngüsü

2. 6. 1. a İnterlökın 1(IL-1)

İnfeksiyon ve diğır inflamatuvar uyarınlara karşı konak yanıtının mediatörüdür. TNF- α ile beraber etki gösterir. Ana kaynağı; aktive mononükleer fagositlerdir. TNF- α ' dan farklı olarak nötrofiller, epitelyal hücreler ve endotel hücreleri tarafından da sentezlenir. IL-1, β ve α olmak üzere iki polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Dolaşımda en çok IL-1 β bulunmaktadır. Düşük dozlarda; lokal inflamasyon medyatörüdür. Endotel hücrelerinde lökosit adezyonunu düzenleyen yüzey moleküllerinin ifadenmesini artırır. Yüksek dozlarda, dolaşıma geçerek endokrin etkiler gösterir. Etkileri doza bağılıdır^{3,4,5,7}.

2. 6. 1. b. IL-2

Diğır adı T lenfosit büyüme faktörüdür. T lenfositlerinden (Th1) ve NK hücrelerinden salınır. Tüm bağıışıklık sistemini pozitif yönde etkiler. Ayrıca salgıları, fagositozu, T lenfosit çoğalmasını, yüzey antijen ifadenmesini artırır. NK hücrelerine de etki ederek sitotoksitesini artırır. IL-2, T hücre üzerine etki ederek IFN- γ ve IL-4 salınımını sağlar.

Otokrin etkilidir. Antijen uyarımı ile işlevsel IL-2 reseptörlerinin ifadenmesi artar. Antijen sunumunda T lenfositleri tarafından salgılanan IL-2, antijene özel hücrelerin çoğalmasından sorumludur. Diğır bağıışıklık sistem hücrelerinin farklılaşma ve çoğalmasını da artırır^{6,7}.

2. 6. 1. c. IL-4

Diğer adı B hücre büyüme faktörüdür. Aktive T hücrelerinden (Th2) salınır. İmmünoglobülin (Ig) izotipinin IgE ifadenmesi dönüşümünün aktivasyonu, IgG1 üretiminde artışın sağlanması, Th2 hücrelerinin aktivasyonu, IFN-γ'nın hücresel bağışıklıktaki etkilerinin inhibisyonu ve inflamatuvar makrofaj deaktivasyonu gibi görevleri vardır. Ayrıca IFN-γ ile oluşmuş makrofaj aktivasyonunun bir inhibitörüdür ^{3,7}.

2. 6. 1. d. IL-6

T lenfosit (özellikle Th2), B lenfosit, makrofaj ve fibroblastlardan salgılanır. Doğal ve kazanılmış bağışıklıkta görev alır. Doğal bağışıklıkta, hepatositlerden akut faz reaktanlarının sentezlenmesi ve kemik iliği öncüllerinden nötrofil yapımını sağlar. Kazanılmış bağışıklıkta ise; antikor yapımı için farklılaşmış B hücrelerinin büyümesini uyarır; myelomlardan köken alan ve monoklonal antikor yapan hibridomaların gelişimini indükler. IL-6 plazmada düşük seviyede ise myeloma; yüksek seviyede ise plazmasitoma; sinoviyal sıvıda artışı romatoid artrit; BOS'taki artışı viral ya da bakteriyel menenjit; idrardaki artışı organ nakli sonrası doku reddinin başladığını gösterir ^{3,7}.

2. 6. 1. e. IL-10

Diğer bir adı sitokin sentezi inhibitör faktörüdür. Th2 hücreleri, B lenfositleri ve makrofajlar tarafından antijen ve bakteriyel ürünlerce uyarıldıktan sonra geç dönemde salgılanır. Th1'lerin üreteceği IL-2 ve IFN- γ yapımını baskılar, bu sayede bağışık yanıt Th2 yönünde gelişir. Makrofajlara ve antijen sunucu hücrelere MHC sınıf 2 ifadenmesini azaltıcı yönde etki eder. Aktive makrofajlardan ve dendritik hücrelerden IL-12 salınımını inhibe ettiği için negatif feedback mekanizmasına iyi bir örnek oluşturur^{3,4}.

2. 6. 1. f. IFN- γ (İnterferon- γ)

Diğer bir adı immün interferondur. En önemli makrofaj uyarıcı sitokindir. Aktive makrofajların fagositte ettikleri antijenleri öldürmesini uyarır. Uyarılmış T lenfositleri tarafından da salgılanır. Makrofajları, NK hücrelerini, nötrofilleri, sitotoksik T lenfositlerini ve B lenfositlerini aktive eden bağışıklık sistemi düzenleyicileridir. APC (antijen sunucu hücre)'ler üzerindeki MHC sınıf 1-2 moleküllerinin ve kostimulatörlerin ifadenmesini artırır. Doğal ve kazanılmış bağışıklıkta kritik öneme sahiptir^{5,7}.

2. 6. 1. g. TNF- α (Tümör Nekroz Faktör- α)

Gram (-) bakterilere ve diğer infeksiyöz ajanlara karşı gelişen akut inflamatuvar yanıtın ana mediyatörüdür. Sentezleyen ana hücreler mononükleer fagositlerdir. Antijen ile uyarılmış T lenfosit, NK ve mast hücreleri tarafından da sentezlenir. Makrofajlardan sentezlenmesini uyaran en kuvvetli uyaran LPS (lipolisakkarit)'dir. T ve NK hücreleri de IFN- γ sentezleyerek TNF- α salınımını artırır. TNF- α , infeksiyon bölgesine nötrofil ve monositlerin çekilmesinde önemli rol oynar. Düşük dozlarda lökositler ve endotelde akut inflamasyonu indükler. Normal dozlarda inflamasyonun sistemik etkilerini düzenler. Yüksek dozlarda septik şokun patolojik anormalliklerine neden olur ^{3,7}.

2. 7. Kandidozda Bağışıklık

Çeşitli nedenlerle (organ nakli, uzun süre antibiyotik kullanımı, AIDS gibi) bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde kandidoz görülme olasılığı oldukça yüksektir. *Candida*'nın konakçıda yaptığı infeksiyonun oluşumunda hem maya hem de konakçıya ait faktörler yer almaktadır ^{1,6}.

Candida türleri hücresel ve humoral bağışıklık sistemlerinin ikisini de aktive etmektedir. Antikor aracılı humoral bağışıklık, sistemik kandidozda hücresel 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 ^{4,23,24,25,26}.

Candida infeksiyonlarında koruyucu özellikte olan hücresel 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^{20,21,22}.

C. albicans'ın kompleman aktivasyonunda kullandığı temel mekanizma alternatif yoldur. Kompleman yolunda C5 bileşiği erken dönemde mayaların eliminasyonunda önemlidir ve C5 defekti bulunan fareler yaygın hastalığa karşı daha duyarlıdır³⁰. Yapılan çalışmalarda *C. albicans*'ın mannan antijenine karşı gelişen antikorların klasik kompleman yolunu aktive ederek nötrofillerin opsonofagositik etkisine katkıda bulundukları gösterilmiştir³¹.

NK hücrelerinin *C. albicans* ile karşılaştırılması sonucunda sitotoksik aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. NK hücrelerinin *Candida*'lara karşı doğal hücresel sitotoksik etkilerinin bulunduğu bildirilmiştir^{2,32}.

Sistemik kandidozda gelişen bağışıklığın asıl elemanları T lenfositleri olsa da diğer bağışıklık sistemi hücrelerinin de rolü olduğu düşünülmektedir. Nötropenik hastalarda bütün kandidoz çeşitleri görülürken, hücresel bağışıklık sistemi bozulmuş olan bireylerde daha çok mukokutanöz kandidoza rastlanmaktadır²⁹.

Polimorfonükleer (PMN) lökositlerin de kandidoz patogenezinde önemli olduğu anlaşılmıştır. PMN hücreleri myeloperoksidaz gibi enzim ve defensinleri ile *Candida* türlerinin fagositozundan sorumludur^{8,11,33}. PMN lökositler, sitokin reseptörleri içermektedir ve bu hücrelerin uygun sitokinlerle uyarılması mantarların yok edilmesini artırıcı etki oluşturabilir. Invivo IFN- γ uygulaması kronik granülomatöz hastalığı olanlarda ciddi infeksiyon sıklığını azaltmıştır. IL-4 ve IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin nötrofillerin kandidisidal aktivitesini bozduğu belirtilmiştir^{20,34,35}.

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

Kandidoz ve diğer mantar infeksiyonlarının immünregülasyonunun anlaşılması için kazanılmış bağışıklığın Th1/Th2 mekanizmasının tam olarak açıklanması çok önemlidir. Th yanıtı, Th1 ve Th2 yanıtı olmak üzere iki grupta gerçekleşir. Bu yanıt salgılanan sitokinlere göre sınıflandırılır²⁹.

Th lenfositleri bağışıklık sistemi orkestrasının şef 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 sağlar⁴⁷.

Aktive olan CD4⁺ T lenfositleri çoğalır ve olgun Th₀ lenfosit halini alır. Bu hücreler, gelecek bağışık yanıtı göre IL-2 ve IFN- γ salgılayan Th1 hücrelerine veya IL-4, IL-5 salgılayan Th2 hücrelerine farklılaşır^{12,47}. Th₀ hücreleri IL-12 varlığında Th1, IL-4 varlığında Th2'ye dönüşür. Th₀ hücrelerinin Th1 ve Th2 hücrelerine farklılaşması TGF- β ve anti-IFN- γ antikorlarla önlenabilir. Son yıllarda Th2 hücrelerinin IL-12 etkisi altında Th1 fenotipine dönebilecekleri gösterilmiştir⁴⁷.

Th1 yanıtı, genellikle infeksiyonun erken evresinde lokal bir yanıt olarak meydana gelir; inflamatuvar sitokinlerden IFN- γ , IL-2, IL-12'nin üretimlerinin artışı ve antifungal efektör hücrelerin makrofaj ve PMN lökositlerin uyarılması ile birliktelik gösterir. Bu hücrelerin salgıladığı sitokinler, Th2 tarafından üretilen IL-10 gibi sitokinlerle inhibe edilir. Th1 hücreleri tarafından salınan sitokinler; TNF- α , IL-1, IFN- γ , IL-12, IL-15'dir. Bu sitokinlerin makrofaj ve nötrofilleri aktive ederek bu hücrelerin kandidisidal etkilerini artırdığı düşünülmektedir. Viral infeksiyonlara ve hücre içi patojenlere karşı savunmayı oluşturur. Bu hücreler hücrel bağışık yanıtın oluşmasında etkin rol oynar^{12,23,24,25,33,34,36}.

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^{3,4,20}. Bu grup sitokinler Th1 yanıtının gelişimini inhibe eder ve fagositik efektör hücrelerin aktivasyonunu engeller. Th2 yanıtının yüksek olması, konakçının ilerleyici tarzda enfeksiyona maruz kaldığının göstergesidir. 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. Bu hücreler Th1 hücrelerinin aksine CD30 yüzey reseptörü ve kemokin reseptörü (CCR3) taşır^{20,33,36}.

IL-3 ve GM-CSF gibi bazı sitokinler hem Th1 hem de Th2 hücreleri tarafından salgılanır.

Fungal enfeksiyonlara karşı primer koruyucu yanıt Th1 aracılı inflamatuvar reaksiyonlarla gerçekleşir. Bu yanıtın eksik olduğu hastalar fungal enfeksiyonlara duyarlıdır. Th1 yanıtının kandidoza karşı koruyucu etkisi olduğu, Th1 yanıtının Th2 yanıtına baskın olduğu düşünülmektedir^{8,20,33,37}.

Tüm mikroorganizmalarda olduğu gibi, mantarlar da, antijen sunucu hücreler tarafından işlendikten sonra T lenfositlerine sunulur. Fungal antijenler lizozomun asidik veziküllerinde peptid parçalarına ayrılır. Bunlar MHC sınıf 2 antijenlerine bağlanarak, MHC-peptid kompleksi şeklinde hücre yüzeyine sunulur ve spesifik CD4⁺ Th lenfositleri tarafından tanınır³³.

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

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

C. albicans'a karşı savunmada TLR2 ve TLR4'ün önemi gösterilmiştir^{23,24,33,38}. TLR2, makrofajlardan *C. albicans* aracılığı ile TNF- α salgılanması için gerekli bir moleküldür. TLR2'ye spesifik antikörler, insan mononükleer hücrelerinde *C. albicans*'ın uyardığı TNF- α ve IL-1 β salınımını inhibe eder^{4,23,24,25}.

Dalakta süzülen kan lenfosit ve makrofajların gözetiminde süzülür. Mikroorganizmalar ve hücre artıkları ayıklanır. Dalak bağışıklık sistemin bir organı olarak, etkin humoral ve hücrel yanıtları oluşturarak organizmanın savunmasına katılır. Güçlü fagositik aktivitesi ile kanı yabancı mikroorganizmalardan filtre eder.

2. 8. Kandidozda Tanı

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

İzole edilen mayanın *C. albicans* olduğu germ tüp deneyi ile tespit edilebilir. *C. albicans*'ı diğer türlerden ayırmak için başka metodlar da vardır.

Şüpheli materyal Levine's Eozin Metilen Mavisı Agarına ekilir. Bu besiyerinde sadece *C. albicans* radyal ve miçelyal gelişir, diğer *Candida*'lar gelişemez¹⁴.

*Candida*ları ayırt etmek için Bizmut-Glisin-Glukoz-Maya-Ekstresi Jelozuna veya içerisine tetrazolyum ilave edilmiş Pagano-Levin besiyerine

ekilebilir. Pagano-Levin besiyerinde diğer bütün *Candida*'lar tetrazolyumu, dehidrogenaz aracılığı ile formazan'a indirger ve kolonileri kırmızıdır. *C. albicans* tetrazolyum'u indirgemez, kolonileri opaktır ¹⁴.

Ayırıcı tanı için bir öze dolusu şüpheli koloni anti-kandidiyal antikorlar (C3a prob) içeren ticari solüsyonlar ile lam üzerinde muamele edilerek aglütinasyon aranabilir. API ZYM ve API 20C test kitleri *Candida*'ları tiplendirebilir ¹⁴.

Candida türlerinin kan kültürlerinden izole edilmesi için; klasik yöntemlerin yanı sıra son yıllarda kullanılmaya başlanan otomatize ve hızlı sistemler de vardır. Ancak bu yöntemler gerek birbirleri ile ve gerekse klasik yöntemlerle her zaman uyumlu değildir. Horvart ve ark. yaptıkları denemelerde, yeni kullanıma giren otomatize iki kan kültürü yöntemi BacT/ALERT ve BACTEC sistemlerini karşılaştırarak güvenilirliklerini belirlemeye çalışmış ve *Candida* türlerinin çeşitli ortamlarda bulunma durumlarına göre BacT/ALERT sisteminin BACTEC sistemine oranla daha duyarlı (% 90) olduğunu belirlemişlerdir ^{39,40}.

Değiştirilmiş bir kan kültür yöntemi olan "lisis santrifügasyon sistemi"nin invaziv kandidemi olgularında kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu yöntemin duyarlılığı % 43 olarak belirlenmiştir ⁴¹.

En son kullanıma sunulan FTIR (fourier transform infrared spectroscopy) yöntemi mayanın kimyasal özelliklerine bakılarak türlerin net olarak birbirinden ayrılmasına ve kısa süre içerisinde tür tanımı yapılmasına olanak sağlamaktadır ⁴².

C. albicans'ı diğer *Candida*'lardan ayırmak için hayvan deneyleri de yapılabilir. *C. albicans* tavşana verildiğinde böbrek ve beyinde lezyonlar gelişerek 4-5 günde öldürür. Diğer *Candida*'larda ölüm görülmez ¹⁴.

İnvaziv kandidozun mikrobiyolojik ve klinik tanınmasındaki problemler, kültüre dayalı olmayan tekniklerin doğmasına neden olmuştur. *Candida*'ya yönelik oluşturulmuş antikorların tanınmasıyla başlayan tanı

aşamaları, günümüzde mayanın hücre komponentleri (D-arabinitol, mannoz, hücre duvarın bir parçası olan β -glukan) ve *Candida* nükleik asiti hedef alınarak oluşturulmuş moleküler tekniklerle tanı kolaylaştırılmaya çalışılmaktadır ⁴⁶.

Sistemik kandidozun sadece klinik belirtiler ile tanınması oldukça zordur. Bu yüzden, tanı için kültür, serolojik, histopatolojik ve moleküler yöntemler kullanılmalıdır. Moleküler yöntemlerin kullanılmasının esas amacı, patojen mantarın klinik örnekte kültürü yapılmadan önce saptanması veya geleneksel yöntemlerle kültürde üretilmiş olan mantarın hızlı tanımlanmasıdır ^{43,44,45,46}.

Sitokin salınımının ölçülmesi için çeşitli methodlar geliştirilmiştir: ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), ELISPOT (The Enzyme-linked immunosorbent spot) , RT-PCR (Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu), immunohistokimyasal ve intra selüler sitokin boyama (ICSS). Bu sistemlerin avantajları ve dezavantajları vardır: ELISPOT ve ICCS sitokin üreten hücrelerin frekansını tahmin etmede en uygun yollardır; ELISA salgılanan proteinin tüm miktarını ölçer; RT-PCR yarı kantitatif seviyelerde indüklenebilir mRNA'yı ölçer. İmmunohistokimya dokularda sitokin üreten hücrelerin lokalizasyonunda faydalıdır ⁴⁸.

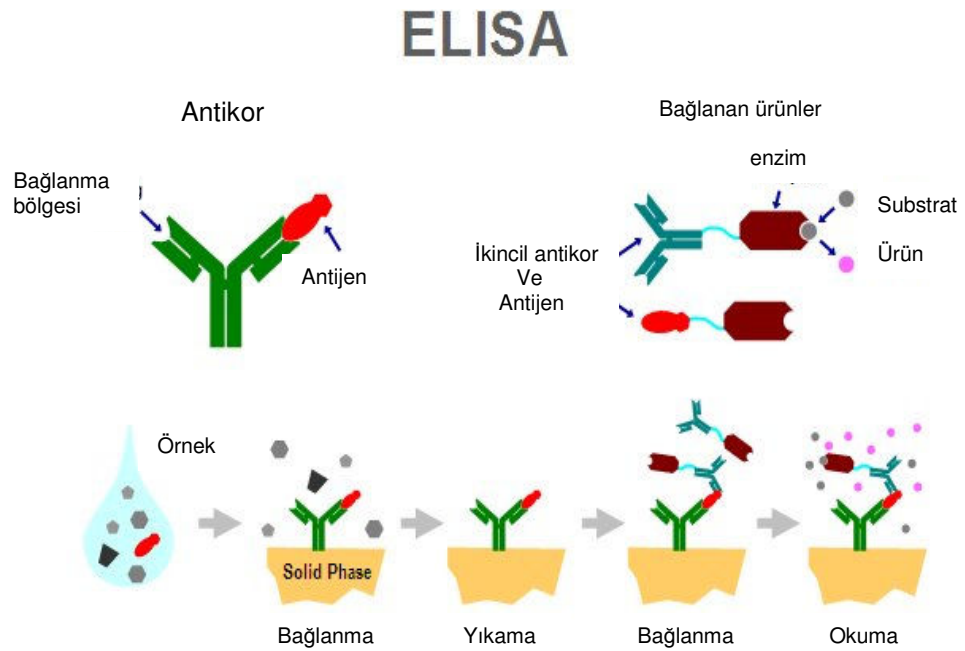
Son yıllarda çeşitli amaçlarla da kullanılan ELISA yöntemi, birçok klinik örnekte mikroorganizmaya ait yapıları türe özgül olarak kısa sürede tespit edilebilmektedir.

2. 8. 1. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Enzyme Immun Assay (EIA) olarak da adlandırılan bu yöntem esas olarak, özgül antijen-antikör bağlanmasını göstermek amacıyla enzimle

işaretili konjugat ve enzim substratı kullanılarak renklendirilmesi esasına dayanır. Substrat, enzimin etki ettiği ve enzime spesifik olan maddedir.

ELISA'nın çok duyarlı ve güvenilir olması, kolay uygulanabilir olması, işaretili immün ayraçların uzun süre saklanabilmesi, radyoizotopların kullanımı sonrası atıkların yok edilmesi önleminin gerekmemesi ve enzim işaretleri için kromojenik substrat kullanılarak görülebilir ve okunabilir sonuçlar vermesi gibi özellikler sistemin avantajlı yanlarıdır. Bunun yanında özel cihazlara gereksinim bulunması ve pahalı olması ise sistemin dezavantajları olarak sayılabilir ^{3,49,50}.

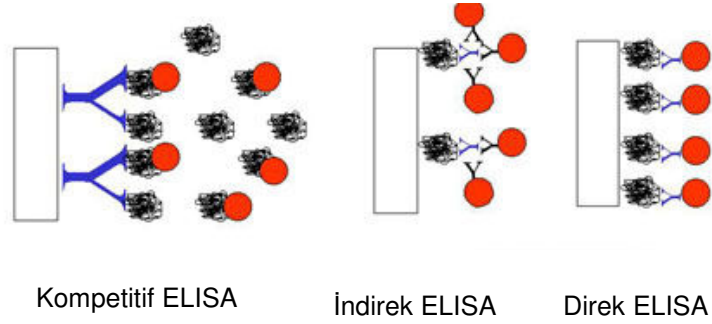


Şekil 4: ELISA Yöntemi

Parazitolojik tanıda antijen veya antikor arama prensibine dayanarak kullanılan ELISA yöntemleri direk ELISA, indirek ELISA, dot-ELISA, kompetitif ELISA yöntemleridir ^{49,50,51}.

Direk ELISA'da; katı ortamda, bilinen antikora aynı anda antijen aranacak şüpheli materyalin eklenmesiyle yapılır. İndirek ELISA ise bilinen antikora şüpheli materyal yanında hayvan kökenli özgül antikorların eklenmesi ile yapılmaktadır. Dot-ELISA yönteminde antijen, ELISA plakları yerine nitroselüloz membrana emdirilerek şüphelenilen örnekte antikor ya da antijen aranmaktadır ⁴⁹.

Kompetitif ELISA (cELISA) yönteminin prensibi de antijen antikor reaksiyonuna dayanır. Burada işaretli antijen ile işaretli antijen antikorlar reaksiyona girmek için yarışır. İşaretsiz antijen tayin etmek istediğimiz maddedir. İşaretli antijenin hazırlanmasında işaretleyici olarak enzim kullanılır. cELISA ile işaretli antikorlar (sekonder antikor) kullanılarak da şüpheli serumda antikor aramak mümkündür. Reaksiyonun tamamlanmasından sonra ayırma işlemi yapılır ve ortama substrat ilave edilerek fotometrik yolla enzim aktivitesi ölçülür. Belirgin renk değişimi, primer antikorların engellendiği veya hiç olmadığını, dolayısıyla şüpheli serumda etkene ait antikorun bulunmadığını gösterir. Primer antikorların antijenlere bağlanmasının engellenmesinden kaynaklanan zayıf renk değişimi ise, şüpheli serumda etkene ait antikor varlığını gösterir ⁴⁹.



Şekil 5: Kompetitif, İndirek ve Direk ELISA Yöntemleri

Günümüzde birçok tanı laboratuvarlarında yaygın olarak ELISA testleri kullanılmaktadır. Bu testlerin avantajları arasında geniş infeksiyon tanı parametrelerinin ticari olarak temin edilmesi, yöntemin otomasyona uyarlanabilirliği ve böylece çok sayıda örneğin kısa sürede çalışılabilmesi, sonuçların spektrofotometrede objektif olarak -kalitatif, semikantitatif ya da kantitatif- değerlendirilmesi gibi özellikler sayılabilir ⁴⁹.

a) Katı Faz (Matriks)

Manuel ELISA yöntemlerinde kullanılan katı faz, genellikle çukurlarına antijen veya antikor bağlanmış olduğu 96 çukurlu düz tabanlı polistern mikropleytlerdir ⁴⁹.

b) Enzim ve Substratlar

Konjugatın işaretlenmesinde en çok kullanılan enzimler alkalin fosfataz (AP) ve horseradish peroksidaz (HRP) enzimleridir. ELISA yöntemlerinde AP için kullanılan substrat BCIP/NBT (5-bromo-4kloro-3-indolil fosfat/nitro mavi tetrazolium), HRP için ise TMB (tetrametillbenzidin)'dir. Bu enzimlerin kromojenik substratları ile birleşmesi ile renk değişimi olur.

Son yıllarda işaretleme maddesi olarak kullanılan biotin-avidin sistemleri, moleküller arasında bağlanma bölgelerinin daha fazla olması, bağlanmalarının daha özgül olması ve kuvvetli olması gibi nedenlerle oluşan sinyal miktarını artırmakta ve böylece ELISA yöntemlerinin duyarlılığını yükseltmektedir. Bu yöntemde antikor molekülü biotin ile işaretlidir, ortama enzimle işaretli streptavidin eklendiğinde biotin ile kuvvetle bağlanır ve daha sonra substratın eklenmesi ile renk değişimi ortaya çıkar ⁴⁹.

c) Yıkama

ELISA yönteminde her bir safha arasında fosfatlı tampon solüsyonu (PBS, wash buffer) ile yıkama işlemi önemli yer tutar. Bu işlem, özgül bağlanmaları etkilemezken özgül olmayan bağlanmaları gidermektedir. Yıkama işlemleri iyi yapılmadığında yalancı pozitiflikler saptanabilir ⁴⁹.

d) Durdurma

ELISA' nın son safhası olan "reaksiyonun durdurulması" basamağında asidik veya bazik çözeltiler (H_2SO_4 , HCl, NaOH) kullanılır. Böylece enzim-substrat reaksiyonu istenilen sürede sona erdirilir. Bu işlemin yapılmaması ya da geç yapılması, kromojenik substratın bir süre

sonra kendiliğinden renk değiştirmesine, dolayısıyla da geçersiz sonuçların elde edilmesine yol açar ⁴⁹.

e) Okuma

Reaksiyon sonunda oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülür. Okumada en sık kullanılan dalga boyları 405, 450 ve 630 nm' dir. Sonuçlar tek bir dalga boyunda okutulabileceği gibi çift dalga boyuyla da okutulabilir. Çukurların renk şiddeti (optik dansite) rnekteki antikor veya antijenin konsantrasyonu ile ilişkilidir.

ELISA yöntemi özgül antijen-antikor bağlanmasını göstermek amacı ile enzimle işaretili konjugat ve enzim substratı kullanılarak renklendirilmesi esasına dayanır. Özgül olan antikor antijen bağlanması sayesinde antikorlar ile örneklerdeki bu antikora özgül antijenin varlığını, antijenler ile de özgül antikorları tespit edilir.

2. 8. 1. a. ELISA Yönteminin Uygulanması

- 1) Katı faza bilinen bir antijen/antikor bağlanır.
- 2) Antijen/antikor bağlı çukurlara örnekler ve standartlar eklenerek oda ısısında veya 37 C' de belirli bir süre bekletilir.
- 3) İnkübasyon sonunda çukurlara eklenmiş olan örnekler dökülerek kuyucuklar tamponlanmış sıvı ile yıkanır. Çukura eklenen örnekler içinde özgül antikor var ise katı fazdaki antijene bağlandığı için yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırılmaz.
- 4) Katı fazdaki antijene bağlanmış olan IgG yapısındaki antikoru saptamak amacı ile çukurlara Fc kısmı enzim ile işaretili anti-IgG antikoru eklenir. (IgM yapısındaki antikoru saptamak için ise üzerine enzimle işaretili anti-IgM antikoru eklenir). Enzim ile işaretili anti-IgG antikorları konjugat olarak tanımlanmaktadır.

- 5) Çukurlara konjugat eklendikten sonra plak belirli bir süre bekletilir. İnkübasyon sonunda çukurlara eklenen konjugat dökülür, tamponlanmış sıvı ile yıkanır.
- 6) Yıkama işlemi sonunda ortamda bağlı kalan konjugatın gösterilmesi amacıyla çukurlara konjugattaki enzime uygun substrat ve reaksiyonun görünür hale gelmesi için kromojen içeren karışım eklenir.
- 7) Çukurlara eklenmiş renksiz enzim substratı belirli bir süre sonrasında konjugattaki enzimin etkisiyle renklenir.
- 8) Enzim aktivitesini durdurmak amacı ile H_2SO_4 eklenir ve oluşan rengin koyuluğu ELISA okuyucusunda değerlendirilir. Plaktaki bazı çukurlara miktarı bilinmeyen standart antikor eklenirse, bu çukurlardan elde edilen optik dansite (OD) eğrisi ile içeriği bilinmeyen örneklerdeki antikor miktarı saptanabilir.

2. 8. 1. b. ELISA ile Antijen tespiti

2. 8. 1. b. 1. Yarışmasız (non-competitive) Yöntem

- Araştırılacak olan antijene özgül antikorlar mikroplyet çukurlarına bağlıdır. Örnekler çukurlara eklenir. Antijen varsa antikorla özgül olarak birleşir.
- İnkübasyona bırakılarak sonrasında 3 kez yıkama işlemi yapılır.
- Çukurlara bu kez yine antijene özgül ve enzimle işretli antikor (konjugat) eklenir.
- Yıkamadan sonra kromojenik substrat eklenir.
- Durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırılır.
- Renk şiddeti spektrofotometrede okutulur ve absorbans değerleri saptanır.
- Direk veya indirek yöntemlerle uygulanabilir.

2. 8. 1. b. 2. Yarışmalı (competitive) Yöntem

- Mikropleyt çukurlarına özgül antikor bağlıdır. Çukurlara antijen araştırılacak örnek ile birlikte aynı anda enzimle işaretli hazır antijen eklenir. Örnekteki antijenler ile işaretli antijenler, antikorlara bağlanmak için yarışa girer.
- İnkübasyon ve yıkama işleminden sonra çukurlara kromojenik substrat eklenir.
- Reaksiyon sonucu oluşan renk değişikliği, örneklerdeki antijen miktarı ile ters orantılıdır. Örnekte ne kadar az antijen varsa antikorlarla birleşen işaretli antijen miktarı da o kadar fazla olacaktır.
- Sonuçlar spektrofometrik olarak değerlendirilir.

2. 8. 1. c. ELISA ile Antikor Tespiti

- Mikropleyt çukurlarına özgül antijen bağlıdır. Çukurlara örnek dilüsyonları eklenir. Özgül antikor (IgG veya IgM) varsa antijenle birleşir.
- İnkübasyon ve yıkama işleminden sonra hangi tip antikor araştırılıyorsa ona özgül konjugat eklenir. (IgG araştırılıyorsa enzimle işaretli anti-insan IgG, IgM araştırılıyorsa enzimle işaretli anti-insan IgM)
- İnkübasyon ve yıkama sonrası çukurlara kromojenik substrat eklenir.
- Reaksiyon sonucu oluşan renk değişikliği örnekteki antikor miktarı ile doğru orantılıdır ve spekrofotometrik olarak değerlendirilir.

2. 8. 1. d. ELISA Yönteminde Sonuçların Değerlendirilmesi

ELISA yönteminde enzim-substrat reaksiyonu sonucu ortaya çıkan renk değişimi spektrofotometrik olarak ölçülür ve elde edilen absorbans değerleri “optik dansite” olarak ifade edilir. Kullanılan ELISA kitinin özelliğine göre, kontrol yada standartlardan alınan OD değerleri örneklerin OD’leri ile oranlanarak kalitatif, semi kantitatif ve ya kantitatif sonuçlar elde edilir ⁴⁹.

Kalitatif sonuç; sonuç veren bir yöntemde kitin önerisine göre “pozitif ve negatif kontrol serumları” veya “kalibratör serumlar” kullanılabilir. Bu serumların OD’lerinden hesaplanan bir “cut off” (eşik değeri) vardır. Örneklerin OD’leri buna göre değerlendirilerek pozitif ya da negatif diye sonuç verilir. Bu tip sonuçlar genellikle antijen varlığının veya yokluğunun belirlenmesinde değerlidir. IgG düzeylerinin ölçülmesi ve takibinde değer taşımazlar ⁴⁹.

Semikantitatif olarak sonuç veren bir yöntemde, benzer olarak “pozitif ve negatif kontrol serumları” ve ya “kalibratör serumlar” kullanılabilir. Ancak burada örneklerden alınan OD’ler cut off OD’sine bölünerek sayısal bir değer elde edilir. Bu değer örnekte bulunan antikor düzeyinin gerçek değeri olmayıp rölatif bir değeri ifade eder. Bir örnek değerinin, kitte önerilen referans aralığının üzerinde olması, belirli bir düzeydeki pozitifliği göstermektedir. Bu tip sonuçlar antikor konsantrasyonunun ölçülmesinde değer taşımaz, ancak antikor düzeyinin takibinde kullanılır ⁴⁹.

Kantitatif sonuç veren bir yöntemde, konsantrasyonları bilinen “standart örnekler” kullanılır. Farklı kitlelere göre değişmek üzere kitin içerdiği standart örnek sayısı 3-8 arasında değişmektedir. Standart örneklerin sayısı ne kadar fazla ise ölçüm aralığı o kadar geniş olur. Bu tip değerlendirmede, standart örneklerin konsantrasyonlarına karşılık OD’leri kullanılarak bir grafik elde edilir ve araştırılan örneklerin OD’lerinin bu grafikteki karşılıkları gerçek değer olarak ifade edilir (Ör; IU/ml, pg/ml,

nmol/ml gibi). Bu tip sonuçlar antikor konsantrasyonlarının ölçülmesinde ve antikor düzeyinin takibinde değer taşımaktadır ⁴⁹.

Bu çalışma, deneysel olarak kandidemi oluşturulmuş farelerde; dalak dokusunda infeksiyonla birlikte salınan bazı sitokinlerin (TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-2, IL-1 β , IL-4, IL-6) salınımının, ELISA yöntemi kullanılarak gösterilmesi için tasarlanmış ve bu şekilde *C. albicans* infeksiyonu sırasında oluşan sitokin profillerindeki değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇLER

3. 1. Cihazlar

Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

Kuru Isı Bloğu (Boeco, Almanya)

Mikrosantrifüj (Heraeus, Almanya)

Santrifüj Cihazı (Hermle Z380, BioTek, Almanya)

Derin Dondurucu (Uğur, Türkiye)

Etüv (%5'lik CO₂'li)(Revco, Amerika)

Hassas Terazı (Shimadzu, Japonya)

Otoklav (Sanyo, Japonya)

Pastör Fırını (Electro-mag, Türkiye)

Spektrofotometre (Roche, Amerika)

Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (Apollo Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

Işık Mikroskobu (Olympus, Japonya)

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

Mikropipetler ve uçları (Beta Pette™, Amerika)

Makas (Dizdarer, Ankara)

Pens (Dizdarer, Ankara)

Penset (Dizdarer, Ankara)

Vorteks (Heidolph, Almanya)

pH-metre (Fisher Scientific, Amerika)

Süzgeç (Dizdarer, Ankara)

Hücre süzgeci (BD Falcon, Amerika)

Enjektör (Süperset, Türkiye)

Filtre (0,22µ'luk) (Orange Scientific, Belçika)
Tüp(15-50cc) (TPP, İskoçya)
Pastör pipeti (LP ITALIANA SPA, İtalya)
Neumber lamı (REIGHERT, Amerika)
Plak (24 kuyucuklu) (TPP, İskoçya)
ELISA okuyucusu ve yıkama cihazı (Bio-tek, Amerika)

3. 2. Kimyasal Maddeler

Etil Alkol (Riedel-de Haen, Almanya)
Saboroud Dextrose Agar (SDA) (Oxoid, İngiltere)
Tripan Mavisi (Applichem, Almanya)
Gentamisin (İ.E. Ulagay, Türkiye)
Ampisilin (Mustafa Nevzat, Türkiye)
NH₄Cl (Sigma, Amerika)
Trisma Base (Sigma, Almanya)
HCl (J. T. Baker, Hollanda)
RPMI - 1640 besiyeri (Sigma, Amerika)
Penisilin (Biochrom AG , Almanya)
Streptomisin (Biochrom AG , Almanya)
MEM (Minimal Essential Medium) Sodyum Piruvat (Gibco, İskoçya)
FBS (Fetal Bovine Serum) (Isı ile inaktive edilmiş) (Biochrom AG, Almanya)
L- Glutamine (Biochrom AG , Almanya)
Siprofloksasin (Bio Farma, Türkiye)

β -2 merkapttoetanol (Fluca Biochemica, Almanya)

LPS (Lipopolisakkarit) (*E.coli*) (MP Biomedicals, Almanya)

PBS (Biochrom AG , Almanya)

Serum fizyolojik (Eczacıbaşı, Türkiye)

Ketalar (Pfizer, Türkiye)

ELISA kiti (Biosource, Belçika)

3. 3. Diğerleri

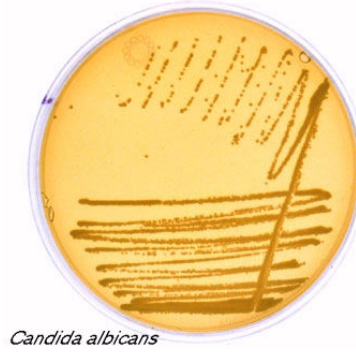
-*Swiss albino* sıçan, 25-30 gr, 6-8 haftalık dişi (Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi)

-*Candida albicans* ATCC 10231 referans suşu

4. YÖNTEMLER

4. 1. Suşlar

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



Şekil 6 : Besiyerinde *C.albicans* görünümü

4. 2. Hayvan Modeli

Deney koşulları, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde, Etik Kurul Yönergesine uygun şekilde tamamlanmıştır. Deney hayvanı olarak 6-8 haftalık, 25-30 gr ağırlığındaki 20 adet (10 kontrol + 10 infekte) *Swiss albino* cinsi dişi fare kullanılmıştır. Infekte grup olarak seçilen 10 adet farede bakteriyel infeksiyonları engellemek için gentamisin (6 mg/kg) ile ampicilin (10

mg/kg) intramüsküler uygulanmıştır. Farelere, içerisinde ml'de 1×10^6 *C. albicans* hücresi bulunan maya süspansiyonu lateral kuyruk veni ve intraperitoneal olarak verilmiştir. 5 günlük infeksiyon süresinin ardından farelere ketalar (100 mg/kg) ile anestezi uygulanmıştır. Anestezi altında farelerin abdomenleri % 70'lik etil alkol ile silindikten sonra steril makas ve penset yardımı ile açılmıştır. Kontrol grubu ve infekte grubun dalakları alınarak deneylerde aynı gün içinde kullanılmıştır.

4. 3. Besiyerinin Hazırlanması

Ticari olarak saf RPMI-1640 besiyeri içine;

- 100 U/ml Penisilin
- 100 µg/ml Streptomisin
- MEM Sodyum Piruvat
- %10'luk FBS (Isı ile inaktive edilmiş) (56 °C' de 30dk.)
- 2mM L-glutamin
- 10µg/ml Siprofloksasin (0,22µ'lik filtreden süzülerek)
- 0.05mM β-2 merkaptotanol eklenerek besiyeri içinde kimyasalların çözünmesi ve karışımı sağlanmıştır.

4. 4. Dalaktan Hücre İzolasyonu

4. 4. 1. Eritrosit Lizis Aşaması

0,83gr NH_4Cl 100 ml distile su içerisine eklenip vortekslenerek çözünmesi sağlanmıştır. Çözelti 0,22µ'lik filtreden süzülmüştür.

2,05gr Trisma-base 50ml distile su içerisinde çözülmüştür. Karışımın pH'sı HCl ilavesi ile pH 7,3-7,4 olacak şekilde ayarlanmıştır. Toplam hacim 100 ml 'ye distile su ile tamamlanmıştır. Çözelti 0,22µ'lik filtreden süzölmüştür.

Eritrosit lizisi için kullanılan çözeltilerin (NH₄Cl + Tris-HCl) miktarı dalak büyüklüğü ile orantılı olarak belirlenmiştir (yaklaşık 2-3 ml). Dalak hücreleri ile çözeltiler birleştirilerek oda ısısında 2-3 dk. veya +4 °C'de 3-4 dk. beklenerek eritrosit lizis aşaması tamamlanmıştır.

4. 4. 2. Hücrelerin Elde Edilmesi

Kontrol ve infekte gruba ait dalak dokuları besiyeri içeren farklı tüplere alınmıştır.

-Dalak enjektör ile perfüze edilerek süzgecin üzerinde enjektör pistonu ile besiyeri içerisinde ezilmiştir.

-Süzgeçte kalan hücreleri toplamak amacıyla süzgeç besiyeri ile yıkanmıştır.

-Toplanan hücreler özel hücre süzgecinden süzölerek ayrı bir tüpe alınarak üzerine besiyeri ilave edilmiştir.

-Tüp hafifçe alt üst edildikten sonra 1200 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir.

-Santrifüj sonrası üst sıvı atılarak çökelek 2ml besiyeri ile karıştırılmıştır.

-1/20 dilüsyonda hücre/tripan mavisini ile hücreler neumber lamı kullanılarak ışık mikroskobunda sayılmıştır. (1/4 Tripan mavisini/PBS şeklinde çözümlere hazırlanmıştır)

-Elde edilen hücreler 1200 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir.

-Üst sıvı atıldıktan sonra çökelek içerisinde 1/9 dilüsyonda Tris-HCl/ NH₄Cl eklenmiştir ve 2-3 dk. oda ısısında inkübe edilerek eritrosit lizisi sağlanmıştır.

-Karışım üzerine besiyeri ilave edilerek 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir.

-Üst sıvı ortamdaki uzaklaştırılarak çökelek 2 ml besiyeri içerisinde karıştırılarak neumber lamı kullanılarak ışık mikroskopunda hücreler sayılmıştır.

4. 5. LPS Hazırlanması

Hücrelerde meydana gelebilecek immunolojik değişimleri hücre kültüründe daha net olarak gözlemleyebilmek için hücreler LPS (E.coli) ile uyarılmıştır.

Ticari olarak hazır olan LPS (5mg/ml) hücre kültüründe 10 µg/ml olacak şekilde distile su ile çözünerek hazırlanmıştır.

4. 6. Hücre Kültürü

Kontrol ve infekte gruba ait dalaklardan izole edilen mononükleer hücreler farklı kuyucuklarda kültüre alınmıştır.

-İki gruba ait mononükleer hücreler iki kuyucuk olacak ve kuyucuk başına 10⁶ hücre/ml olacak şekilde besiyeri (~1 ml) ile birlikte 24 kuyucuklu plaklara konulmuştur.

-Hücrelerdeki immunolojik değişimi arttırmak ve gözlemleyebilmek için LPS içeren ve içermeyen kuyucuklar negatif ve pozitif kontrol olarak hazırlanmıştır.

-Kontrol ve infekte grup hücreleri 0, 24, 48, 72 saat süresince %5'lik CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

-İnkübasyon süresi tamamlanan kuyucuklardaki üst sıvılar pipetle ependorflara toplanmıştır.

-Ependorflar 2000 rpm'de 3 dk. santrifüj edilmiştir.

-Santrifüj sonrası elde edilen ependorflardaki üst sıvılar yeni ependorflara alınmıştır.

-Sonraki deney aşamalarında kullanılmak üzere -70 °C'de saklanmıştır.

4. 7. ELISA

-Derin dondurucudaki (-70 °C) üst sıvı örnekleri çıkarılarak TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ sitokinlerinin düzeyleri ELISA yöntemi ile firmanın önerileri doğrultusunda kit içerisindeki talimatlara uygun şekilde belirlenmiştir (Biosource).

-Üst sıvı örnekleri ve sitokinlere ait standartlar 96 kuyucuklu mikropaklarda uygun kuyucuklara yerleştirildikten sonra inkübasyon tamponu ile inkübe edilmiştir.

-Daha sonra kuyucuklara Biotin konjugat konulup, plaklar oda ısısında tekrar inkübasyona bırakılmıştır.

-İnkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır ve Streptavidin- Peroxidase (HRP) solüsyonu eklenmiştir.

-Oda ısısında inkübasyonu takiben, plaklar tekrar yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.

-Son aşamada kuyucuklara Kromojen solüsyonu konulup, plaklar oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır.

-Kuyucuklarda oluşan reaksiyon Stop solusyonu ile durdurulmuştur.

-Kuyucuklarda oluşan absorbands değerleri, ELISA okuyucusunda 450 nm'de okutularak değerlendirilmiştir (BioTek).

-Standart eğri, her plak için uygun olan sitokin standartları ile oluşturulmuştur.

-Örneklere ait sitokin düzeyleri, standart eğri üzerinde işaretlenerek, dalak hücrelerine ait sitokin düzeyleri pg/ml cinsinden belirlenmiştir.

4. 8. Kontaminasyona Karşı Koruma

Hücre kültürü steril koşullarda yapılmıştır. Nükleazdan yoksun ependorflar (Costar, Corning, NY, USA) UV ışığında steril edilmiştir. Pipetler hücre kültürü ve ELISA' ya uygun filtreli tipte kullanılmış, reaksiyonlar UV ışığı bulunan biyolojik yönden güvenli kabinde (Metis Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye) yapılmıştır.

4. 9. İstatistiksel Analiz

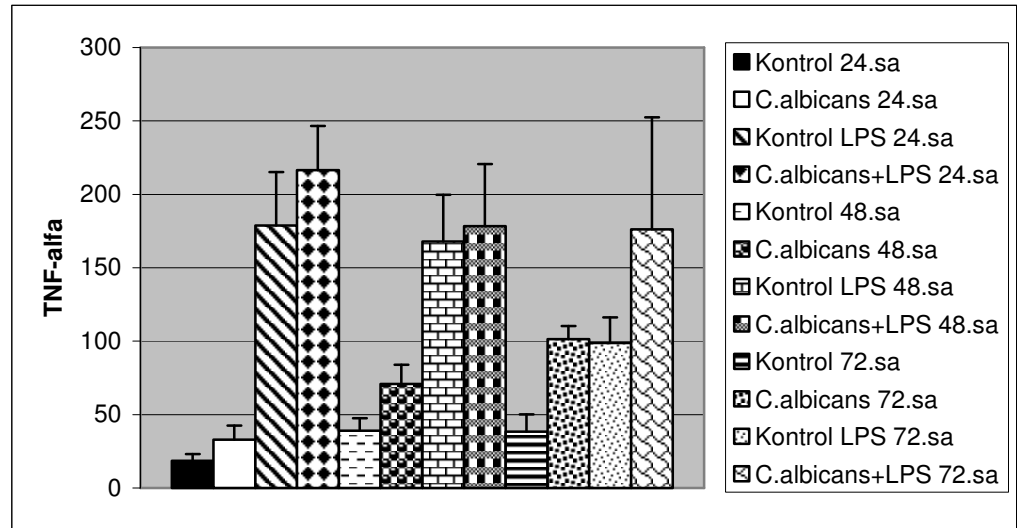
Deneyssel sayılar ve yüzdelere kullanılarak, kontrol ve infekte grup karşılaştırılmasında "Mann-Whitney U testi" kullanılmıştır. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

5. BULGULAR

5. 1. Sitokinlerin salınımının ELISA Sonuçları

5. 1. 1. TNF- α Salınımının Gösterilmesi

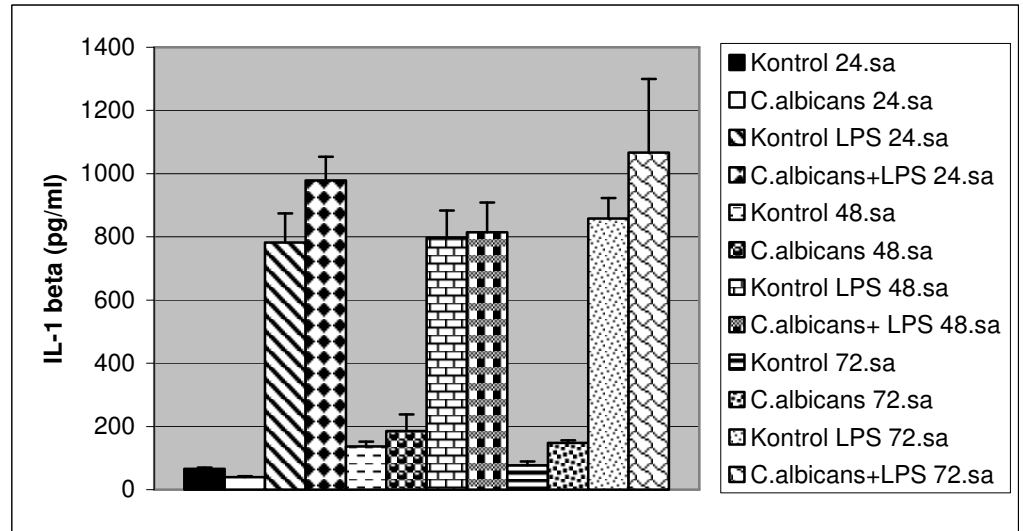
C. albicans ile infekte fare modelinde dalaktan elde edilen mononükleer hücrelerden çeşitli sitokinlerinin salgılanmasının incelendiği çalışmamızda, TNF- α düzeylerinin, gerek Lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış, gerekse uyarılmamış infekte grup mononükleer hücrelerinde infekte olmayan kontrol hücrelerine göre artırmış olduğu belirlenmiştir. Artışların LPS ile uyarımda daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ancak, sadece 72. saatte kontrol hücreleri ile *C. albicans* ile infekte hücreler arasındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$) (Grafik 1).



Grafik 1. *C. albicans* ile infekte ve infekte olmayan fare mononükleer hücrelerinde TNF- α salgılanması (ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası)

5. 1. 2. IL-1 β Salınımının Gösterilmesi

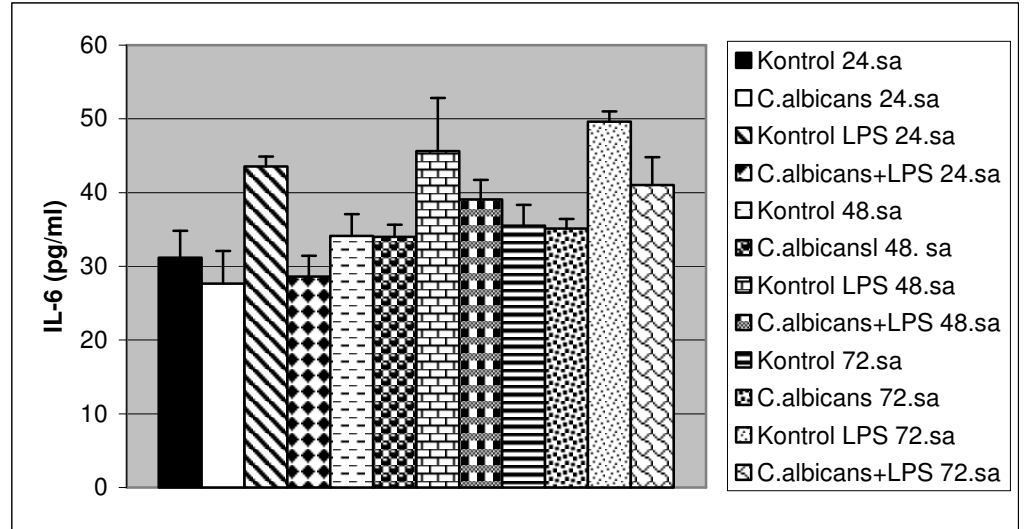
Çalışmamızda incelediğimiz sitokinlerden IL-1 β düzeylerinin ise, *C. albicans* ile infekte hücreler ile kontrol grubu hücreleri arasındaki 24. saat dışında, infekte hücrelerde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu artış, 72. saatte LPS ile uyarılmamış hücrelerde anlamlı düzeylere ulaşmıştır ($p<0.05$) (Grafik 2).



Grafik 2. *C. albicans* ile infekte ve infekte olmayan fare mononükleer hücrelerinde IL-1 β sekresyonu (ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası)

5. 1. 3. IL-6 Salınımının Gösterilmesi

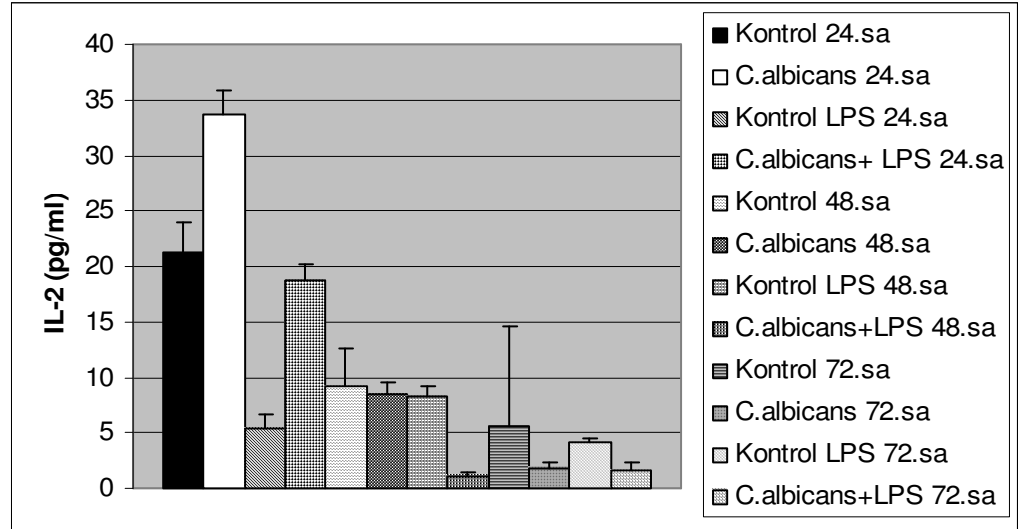
C. albicans ile infekte fare mononükleer hücreleri ile infekte olmayan kontrol grubu fare mononükleer hücrelerinden salgılanmaları incelenen diğer bir sitokin olan IL-6 düzeylerinin, özellikle LPS uyarımı olan hücrelerde infekte grupta kontrol grubuna göre azalma gösterdiği belirlenmiştir. Azalma düzeyleri sadece LPS ile uyarılmış kontrol grubu hücreleri ile *C. albicans* ile infekte hücreler arasında 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Grafik 3).



Grafik 3. *C. albicans* ile infekte ve infekte olmayan fare mononükleer hücrelerinde IL-6 salgılanması (ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası)

5. 1. 4. IL-2 Salınımının Gösterilmesi

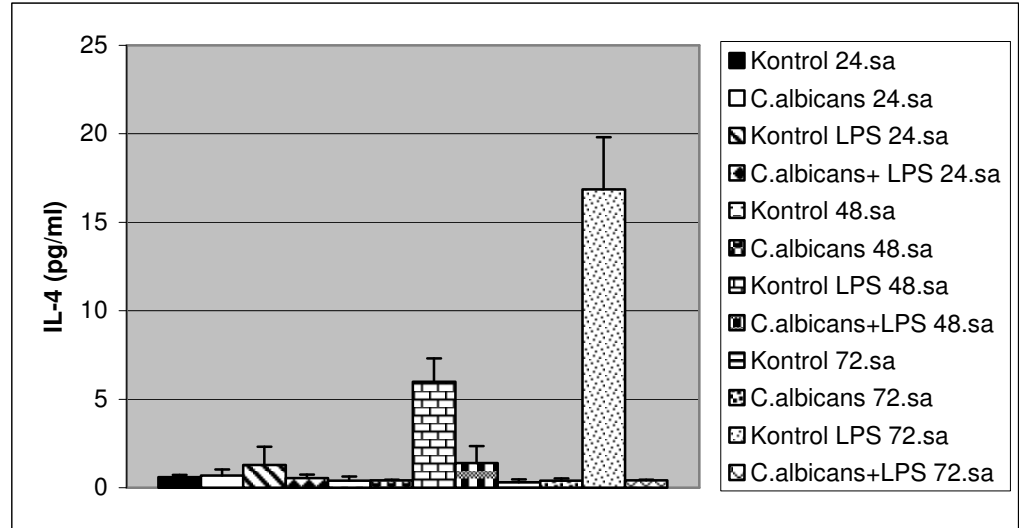
Gruplar arasında düzeyleri karşılaştırılan sitokinlerden IL-2, 24. saatte LPS ile uyarılmış ve uyarılmamış hücrelerde *C. albicans* ile enfeksiyonda anlamlı düzeylerde artış gösterirken, 24.saatı takiben 48. ve 72. saatlerde uyarılmış ve uyarılmamış hücrelerde enfekte grupta anlamlı düzeyde bir artış göstermemiştir ($p<0.05$) (Grafik 4).



Grafik 4. *C. albicans* ile enfekte ve enfekte olmayan fare mononükleer hücrelerinde IL-2 salgılanması (ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası)

5. 1. 5. IL-4 Salınımının Gösterilmesi

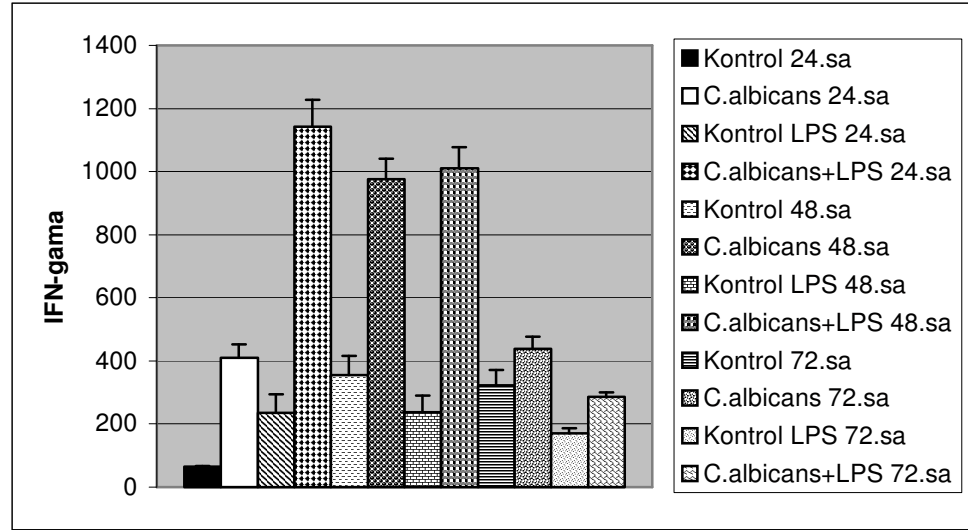
Çalışmamızda, IL-4 düzeyleri genel olarak çok belirgin bir değişiklik göstermemiştir. Ancak, IL-4 düzeyleri, 48. ve 72. saatlerde LPS ile uyarılmış hücrelerde infeksiyonu takiben belirgin olarak istatistiksel düzeylerde anlamlı azalma göstermiştir ($p<0.05$) (Grafik 5).



Grafik 5. *C. albicans* ile infekte ve infekte olmayan fare mononükleer hücrelerinde IL-4 salgılanması (ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası)

5. 1. 6. IFN- γ Salınımının Gösterilmesi

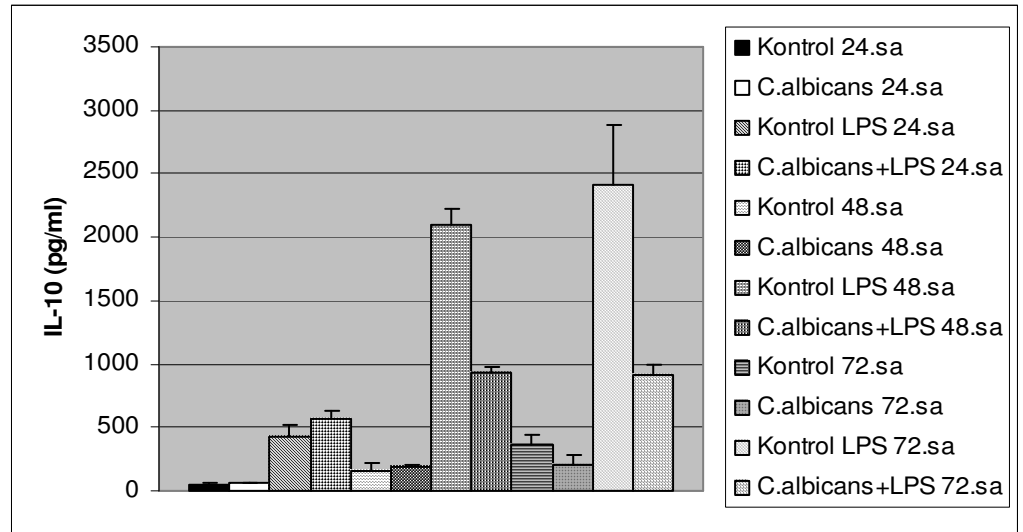
C. albicans ile infekte hücreler ile infekte olmayan kontrol grubuna ait farelerden elde edilen hücreler arasında IFN- γ düzeyleri infekte hücrelerde belirgin artış göstermiştir. Bu artış; 24, 48 ve 72. saatlerde LPS ile uyarılmış ve uyarılmamış hücrelerde infekte grupta kontrol grubu hücrelerine göre anlamlı düzeylere ulaşmıştır ($p<0.05$) (Grafik 6).



Grafik 6. *C. albicans* ile infekte ve infekte olmayan fare mononükleer hücrelerinde IFN- γ salgılanması (ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası)

5. 1. 7. IL-10 Salınımının Gösterilmesi

Çalışmamızda *C. albicans* fare modelinden elde edilen hücreler infekte olmayan kontrol grubu farelere ait hücrelerle kıyaslandığında IL-10 sitokin düzeylerinin 24. saatte anlamlı olmayan düzeylerde artış gösterirken, 48 ve 72. saatlerde LPS ile uyarım sonrası infekte hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde azalma gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$) (Grafik 6).



Grafik 7. *C. albicans* ile infekte ve infekte olmayan fare mononükleer hücrelerinde IL-10 salgılanması (ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası)

6. TARTIŞMA

Her geçen gün artmakta olan mantar infeksiyonları organ nakli, antibiyotik kullanımı, AIDS gibi nedenlerle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde ciddi sorunlar oluşturabilmektedir¹.

Mantar infeksiyonlarının tanısı, tedavide izlenecek yolun belirlenmesi açısından kritik öneme sahiptir. Klasik olarak kültürden etkenin izolasyonu ve tanımlanması, serolojik olarak mantar ürünlerinin gösterilmesi, histopatolojik preparatlarda mantarlara ait hiflerin veya hücrelerin görülmesi ile mantar infeksiyonlarının tanısı konmaktadır. Moleküler yöntemler, yüksek özgüllük ve duyarlılıkları ile son yıllarda mantar infeksiyonlarının tanısında kullanılmaktadır²⁸.

İnvaziv kandidozun tanısında hastalığa özgü klinik bilgilerin dışında mantarın varlığının belirlenmesi oldukça zordur. Son yıllarda geliştirilen ve *Candida*'nın hızlı tanısında kullanılmaya çalışılan testlerin avantajlarının yanı sıra dezavantajları da bulunmaktadır. Lain ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *C. albicans*'ın germ tüpüne özgül hif duvar proteini (Hwp), yoğun bakım hastalarında ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. Sonuçlar blotlama tekniği ile de doğrulanmıştır. Bu çalışmaya göre, %90 özgüllüğü belirlenen ELISA sonuçlarında *C. albicans* germ tüp hücrelerinin Hwp'ne sahip oldukları belirlenmiştir⁷².

Badiee ve arkadaşlarının karaciğer nakli sonucu gelişen invaziv fungal infeksiyonları araştırdığı bir çalışmada klinik örnekler PCR/ELISA metodları kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca kan örnekleri BACTEC sistemi kullanılarak da belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre PCR/ELISA metodlarının karaciğer nakli sonrası gelişen invaziv fungal infeksiyonların erken dönem tanısında yeterli özgüllükte olmadıkları belirlenmiştir⁷¹.

Fungal infeksiyonlara karşı savunmada kullanılan doğal, hücresel/humoral bağışıklık mekanizmalarının şekillenmesi, mantarın birtakım özelliklerinin yanı sıra konağın özellikleri ve infeksiyonun olduğu anatomik bölge ile ilgilidir. Mantarlara karşı bağışık yanıtta, konağın bağışıklık sistemi ile mantarın geliştirdiği birtakım bağışıklık sisteminden kaçış mekanizmaları arasında bir mücadele söz konusudur^{1,4}.

Candida'lara karşı gelişen bağışık yanıtın bütün ayrıntıları tam olarak açıklanmamış olmakla birlikte, doğal ve kazanılmış bağışıklık sisteminin birlikte bu savunmada rol aldığı bilinmektedir. Mantar infeksiyonlarında konağın bağışık durumu önemli bir rol oynar. Son yıllarda mantar infeksiyonları, özellikle bağışıklık sistemi çeşitli sebeplerle baskılanmış veya zayıflatılmış hastalarda artış göstermektedir^{2,3,30,36}.

Doğal bağışıklık, infeksiyonun erken dönemlerinde gelişir ve ökaryotik organizmalara karşı korunmada etkindir. Uyarılan makrofajlar ve diğer bağışıklık sistemi üyeleri "sitokin" olarak tanımlanan ve infeksiyona karşı konak yanıtını düzenleyen polipeptitler üretir. Doğal bağışıklık, sitokin ve kemokin gibi aracı moleküller kullanarak antijen tanınması ve sunumunu gerçekleştirir. Mikroorganizmalar vücuda girdiklerinde ilk olarak, anatomik ve fiziki bariyerler, normal flora ve savunma sistemleri ile karşılaşır. Bu engelleri aşabilen mikroorganizmalar, fagositik hücreler ve antijen sunucu hücrelerle karşılaşır; böylece doğal bağışıklık mekanizması tamamlanır^{2,3,7}.

Candida'lara karşı savunmada mononükleer ve polimorfonükleer lökositler (PMNL) gibi fagositer sistem hücreleri tarafından oluşturulan hücresel yanıt çok önemlidir. Bu hücreler oksidatif ve nonoksidatif mekanizmalarını kullanarak *Candida*'ların hücre içi ve hücre dışı ortamda öldürülmesine katkıda bulunur. Ayrıca makrofajlar, mikroorganizmayı işleyerek Th hücrelerine sunar ve kazanılmış bağışıklık yanıtının başlatılmasında rol oynar. Mononükleer hücreler salgıladıkları sitokinler aracılığı ile de bağışıklık sistemine katkıda bulunur. Nötrofil sayısında

azalma ve nötrofil fonksiyonlarında bozukluk bulunan hastalarda *Candida* enfeksiyonlarının sıklığında önemli bir artış görülmüştür ^{30,36}.

Mantarlara karşı kazanılmış bağışıklıkta B lenfositlerin rolü çok net aydınlatılmamıştır ^{30,36}.

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 ⁷.

Th1 yanıtı, IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α gibi sitokinlerin üretimi ile gerçekleşir ve yeniden enfeksiyonun oluşumuna karşı direnç sağlar. Th2 yanıtında, IL-4, IL-10, IL-6 üretimi görülür ve kronik hastalıkların gelişimi ile ilişkilidir. Th1 sitokinleri hücrel bağışık yanıtı, Th2 sitokinleri ise humoral bağışık yanıtı uyarır. Th1 ve Th2 sitokin profil analizleri, birçok hastalıktaki bağışık yanıtı belirlemede kullanılmaktadır. Th1 ve Th2 sitokinleri arasındaki kritik denge, koruyucu bağışıklığın oluşumunda gereklidir ^{2,7}.

Th1 hücreler, genellikle proinflamatuvar sitokinleri üretir. Proinflamatuvar sitokinlerin oluşumu, bağışık yanıtın erken dönemlerinde artar. Böylece sitokinler mikrobiyal kolonizasyon ve invazyona karşı konak savunma mekanizmasına katkıda bulunmuş olur. Proinflamatuvar sitokinler bu fonksiyonlarını yerine getirirken -dozlarıyla orantılı olarak- ateş, inflamasyon, doku harabiyeti, şok ve ölüme de neden olabilirler. Proinflamatuvar sitokinlerin aktiviteleri, IL-4, IL-10, IL-13 gibi antiinflamatuvar sitokinler tarafından baskılanır. Bu yüzden, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin etkileri arasındaki dengenin hastalığın sonlandırılmasına katkıda bulunduğu düşünülmüştür ^{2,7}.

Sitokinlerin inflamasyonda, hematopoiezde, sistemler ve hücreler arasındaki fizyolojik ilişkilerde ve sonuçta konağın mikroorganizmaya karşı savunmasında önemli görevleri vardır ³.

Th1 tipi sitokinler (TNF- α , IL-1, IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-15) makrofajların fagositoz yeteneklerini güçlendirerek infeksiyonlara karşı savunmayı oluşturur. Th2 tipi sitokinler (IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, TGF- β , IL-6) ise, B hücrelerini antikor sentezlemeye yöneltir. Böylece akut ve kronik inflamasyonu ve geç tipte hücresel aşırı duyarlılığı inhibe ederler^{3,7,30,36}.

Kandidoz, konağın hücresel bağışıklık yanıtında rol oynayan hücrelerin alt popülasyonlarını uyarır. 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 (DTH) 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 10^6 - 10^8 uygulanması), ölü olarak uygulanan mayanın her iki cevabı da arttırdığı gösterilmiştir⁷⁰.

C. albicans, insanlarda fırsatçı fungal infeksiyonlara öncülük eder. *C. albicans* blastosporlarının intravenöz olarak fareye verilmesi sonucunda çeşitli dokularda maya yerleşimi görülür. Fare sistemik kandidozunda Th1 yanıtının gelişimi, fungal patojene karşı koruyucu bağışıklık ile ilgiliyken, Th2 yanıtının gelişimi patolojinin ilerleyişinin kanıtı olduğu düşünülmektedir^{20,23}.

Th1/Th2 sitokin dengesinin *Candida*'lara karşı savunmada oldukça önemli olduğu vurgulanmaktadır. Th1 sitokinlerin koruyucu rol oynadığı, bunun tersine Th2 grubu sitokinlerin *Candida*'ya karşı gelişen bağışık yanıtı bozduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür. Ayrıca invivo Th1 ve Th2 cevaplarının en iyi IFN- γ /IL-4 oranı ile belirlenebileceğini açıklanmıştır⁷.

Yaptığımız çalışmada, *Candida* infeksiyonu sırasında görülen sitokin profillerindeki değişikliklerin belirlenmesi amacıyla, kandidoz oluşturulmuş fare modellerinde Th1 yanıtının göstergesi olarak TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2 ve Th2 yanıtının göstergesi olarak IL-4, IL-6, IL-10 gibi sitokinlerin ifadenmesi incelenmiştir. Elde edilen veriler sağlıklı kontrol grubu farelerle karşılaştırılmıştır.

Sistemik *C. albicans* infeksiyonlarında serumda TNF- α düzeyi hızlı bir artış gösterir ve bu artış ölüme kadar devam eder. Mantar ve mantar bileşenleri ile karşılaşan makrofajlardan salınan TNF- α antifungal etkileri olan nötrofilleri aktive ederek iltihabi bölgeye toplar²⁰.

TNF- α , PMN'lerin endotelial membranlara yapışmasını, PMN'lerin opsonize zimosana karşı fagositik aktivitesini, *C. albicans*'ın hifi ve çözünabilir uyarıcıya karşı O₂ ve H₂O₂ salınımını, PMN'lerin degranülasyonu ve antikora bağlı hücre sitotoksitesini artırır.

Louie ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, *C. albicans* ile infekte farelerin serumlarında TNF- α miktarlarının giderek artış gösterdiği, infekte olmayan farelerde ise hiçbir artışın görülmediği bildirilmektedir. Aynı zamanda TNF- α 'nın varlığının organlardaki fungal yükü azaltarak konak savunmasında olumlu katkıları olduğu bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar, TNF- α 'nın, periferik kandaki lökosit sayısını ve infekte dokulardaki inflamatuvar cevabı etkilemediğini bulmuşlardır. Aynı çalışma sırasında yapılan bir invitro deneyde, TNF- α 'nın direk antikandidal etkisinin olmadığı gösterilmiştir⁶⁹.

Antifungal ilaçların etkisinin ve toksisitesinin mononükleer hücreler tarafından üretilen sitokinlerin üretimi ile ilişkili olabileceği Louie ve ark. tarafından yapılan çalışmada gösterilmeye çalışılmıştır. Flukonazol, 5-florositozin (5-FC), amfoterisin B (AmB) ve lipozomal AmB (LAB)'nin artan konsantrasyonları fare peritoneal makrofajlarından TNF- α salgılanmasını uyarmaktadır. Flukonazol ve 5-FC makrofajlar üzerinde çok fazla uyarıcı bir etki göstermemesine karşın AmB TNF- α uyarımını sağlamaktadır. Bu

sonuçlara göre, AmB' nin toksisitesi ve bağışıklık sistemini düzenleyici özelliği, uyarılmış makrofajlardan salgılanan TNF- α ' yı bağlaması ile ilgili olabileceği, ayrıca AmB yanıtında makrofajlardan üretilen TNF- α 'nın *C. albicans* enfeksiyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. TNF- α yanıtını oluşturan diğer ilaçların (flukanozol, 5- FC ve LAB) eksikliğinin yan etkiler oluşturabileceği söylenmektedir ⁶⁸.

İmir ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *C. albicans* 'ın fare peritoneal makrofajlarından (PM) TNF- α üretimini uyarma kapasitesi araştırılmıştır. *Candida* ile uyarılmış peritoneal makrofajlar ve insan PBMC' lerinin kültür süpernatantlarında TNF- α aktivitesi ELISA yöntemi ile tayin edilmiştir. *C. albicans* doza bağımlı olarak bu iki hücre tipinde TNF- α üretimini uyarmaktadır. Peritoneal makrofajlardan TNF- α üretimini, ısı ile inaktive edilmiş *Candida* hücreleri canlı formlarına oranla daha az uyarmıştır. Canlı *C. albicans* ile yapılan kültürün 24. saat süpernatantları peritoneal makrofajlardan TNF- α üretimi üzerine etkili olmadığı görülmüştür. *Saccharomyces cerevisiae* özütü olan mannan doza bağımlı olarak PM' lardan TNF- α üretimini arttırmaktadır. *Candida*'nın PM' lardan TNF- α üretiminin üzerine etkisi direk olarak mayanın hücre duvarı ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. Ayrıca *C. albicans*' ın diğer *Candida* türlerine oranla daha fazla sitokin üretimini sağladığı bildirilmiştir ⁶⁷.

Bazı proinflatuvar sitokinlerin etkinliği ve akut enfeksiyon anındaki değişimleri Gaforio ve ark. tarafından 2002'de gösterilmiştir. Kandidozdan 24 saat sonra ve LPS ile uyarmı sonucunda TNF- α seviyelerinin kontrole oranla arttığını bildirmişlerdir ⁶⁶.

C. albicans ile infekte fare modelinde dalaktan elde edilen mononükleer hücrelerden çeşitli sitokinlerin salgılanmasının incelendiği çalışmamızda, TNF- α düzeylerinin, gerek LPS ile uyarılmış, gerekse uyarılmamış infekte grup mononükleer hücrelerinde infekte olmayan kontrol hücrelerine göre artmış olduğu belirlenmiştir. Artışların LPS ile uyarımda daha fazla olduğu belirlenmiştir. LPS ile uyarımda belirgin olarak

artan TNF- α düzeylerinin 72. saatte istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$).

İnfeksiyon ve diğer inflamatuvar uyaranlara karşı konak yanıtının mediatörü olan ve TNF- α ile beraber etki gösteren IL-1'in ana kaynağı mononükleer fagositlerdir.

Schaller ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada lokal *Candida albicans* infeksiyonuna karşı konak bağışıklığında antikandidal keratinositlerin ve polimorfonükleer lökositlerin anahtar bir rol oynadığını göstermişlerdir. Bu çalışmada *Candida* ile infekte insan oral epitelyumlarından GM-CSF, keratinositlerden immun sistemi uyarıcı IL-1 β , IL-1 α , TNF- α ve IFN- γ salgılandığı görülmüştür. Bu immun cevabın infeksiyon bölgesine gelen PMN' ler ile ilgili olacağı bildirilmiştir⁶⁵.

İnfeksiyona karşı özgül olmayan dirençte immün sistemi düzenleyici sitokinlerden IL-1 β 'nin artışının uyarıldığı bilinmektedir. Van't ve ark. yapmış olduğu bir çalışmalarında öldürücü *Candida albicans* infeksiyonunda nötropenik farelerin hayatta kalma süreleri üzerine IL-1 β 'nin etkisini incelemişlerdir. Nötropeniye sokulan farelere *Candida* infeksiyonundan 6 saat sonra yada 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 gösterilmiştir⁷³.

Çalışmamızda incelediğimiz sitokinlerden IL-1 β düzeylerinin ise, *C. albicans* ile infekte hücreler ile kontrol grubu hücreleri arasındaki 24. saat dışında, infekte hücrelerde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu artış, 72. saatte LPS ile uyarılmamış hücrelerde anlamlı düzeylere ulaşmıştır ($p<0.05$).

İnvitro ve invivo yapılan çalışmalar IFN- γ 'nın fungisidal fagositler için gerekli temel bir sitokin olduğunu göstermektedir. IFN- γ doğal bağışıklık sistemi hücreleri üzerindeki etkisinin yanı sıra Th hücrelerinin farklılaşmasını erken dönemde düzenlemektedir²⁰.

Almedia ve ark. yaptıkları çalışmada, enfeksiyona dirençli ve duyarlı farelerden izole edilen dendritik hücrelerin *Paracoccidioides brasiliensis*'e karşı oluşturdukları dirençte Th lenfositlerinin nasıl rol oynadıklarını belirlemeyi amaçlamışlardır. T lenfositlerin proliferasyonları karşılaştırıldığında duyarlı fare grubunda dirençli gruba oranla dendritik hücrelerin daha az etkin olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada makrofajlar ve dendritik hücreler gibi farklı antijen sunucu hücrelerin, farklı konsantrasyonlardaki Th1 lenfokinleri ile uyarıldığını belirlemede IL-2 ve IFN- γ 'nın üretimi ölçülmüştür. Dirençli farelerde lenfosit çoğalmasının uyarımında dendritik hücrelerin makrofajlara göre daha etkin olduğu görülmüştür. Bu hücrelerde IL-2 ile IFN- γ üretimi açısından önemli bir farklılık görülmemiştir. Duyarlı farelerin hücreleri kullanıldığında makrofajların lenfosit çoğalmasında uyarımda dendritik hücrelerden daha duyarlı olduğu görülmüş ve Th1 sitokin üretiminde ise fark gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlar makrofajlar ve dendritik hücrelerin düşük etkinliğini akla getirmektedir. Invitro olarak Th1 lenfokinleri, uyarılan hücreler tarafından salınır ve invivo olarak hastalığın ilerleyişinin bir belirtisi olabilir⁶⁴.

Elahi ve ark. tarafından, *Candida* enfeksiyonlarına duyarlı ve dirençli iki farklı fare modelinde yapılan çalışmada, enfeksiyona 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 bildirilmiştir⁶³.

Kaposzta ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, IFN- γ 'nın invaziv kandidozda hayatta kalma şansını artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca bağışıklık sistemi defekti bulunan ve bulunmayan iki farklı fare grubunda, çeşitli doku ve organlardaki IFN- γ 'nın yokluğu ile oluşan yetersiz lokal bağışık yanıtın, kandidozla daha da artabileceği gösterilmiştir ⁶².

Marodi ve arkadaşlarının yaptığı invitro bir çalışmada opsonize ve opsonize olmamış *C. albicans* kullanmış ve IFN- γ 'nın monosit/makrofajların kandidisidal aktivitesini artırıp artırmadığını incelemiştir. Sonuçta, IFN- γ 'nın bu hücrelerin kandidisidal aktivitesini her iki durumda artırdığını göstermişlerdir. Zaman geçtikçe hücre kültüründe hem fagosite edilen *Candida* sayısının arttığı, hem de salınan sitokin düzeylerinde artış görüldüğü belirlenmiştir ²⁷.

Yapmış olduğumuz çalışmada *C. albicans* ile infekte hücrelerden salınan IFN- γ düzeylerindeki artışlar yukarıdaki araştırmacıların elde ettikleri sonuçlarla uyumlu bulunmuştur. *C. albicans* ile infekte hücreler ile infekte olmayan kontrol grubuna ait farelerden elde edilen hücreler arasındaki IFN- γ düzeyleri infekte hücrelerde belirgin artış göstermiştir. Bu artış; 24, 48 ve 72. saatlerde LPS ile uyarılmış ve uyarılmamış hücrelerde infekte grupta kontrol grubu hücrelerine göre anlamlı düzeylere ulaşmıştır ($p<0.05$).

T hücrelerinden (Th2), B hücrelerinden, makrofajlardan ve fibroblastlardan salgılanan IL-6 doğal ve kazanılmış bağışıklıkta görev alır ^{7,8}.

Farah ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada orofarengeal kandidozda meydana gelen immunolojik değişimler belirlenmeye çalışılmıştır. Farelerdeki farklı bağışıklık sistem hücreleri kimyasal madde ile inaktive edilerek *C. albicans* hücreleri ile infeksiyon modeli oluşturulmuştur. CD4+ ve CD8+ T lenfositlerinin yok edilmesi tek başına oral infeksiyonun şiddetini kontrol grubuna göre arttırmamıştır. PMN ve MNC hücrelerinin birlikte inaktive edilmesi farelerde oral infeksiyonun

şiddetini önemli ölçüde arttırmıştır. Yüksek seviyelerdeki IFN- γ ve IL-2 iyileşen hayvanların lenf nodlarından izole edilmiştir. Bununla birlikte IL-6, TNF- α ve IFN- γ hem infekte edilmiş hem de infekte edilmemiş farelerin oral mukozasında saptanmıştır. Bu sonuçlar ışığında orofarengeal kandidiazisin iyileşmesinde IL-12 ve IFN- γ gibi Th1 sitokinlerinin rol aldığı, ayrıca monosit ve nötrofil fonksiyonlarının CD4+ T hücre artışına bağlı olduğu söylenmektedir ⁶¹.

Nakagawa ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *C. albicans*' a özgül β -glukan ile insan PBMC'leri kültüre edilerek oluşan sitokinler değerlendirilmiştir. Monosit hücre kültürlerinde proinflamatuvar sitokinlerin artışı ile baskılanmış IL-6, IL-2 ve IFN- γ seviyeleri görülmüştür. Bu sonuçlara göre *C. albicans*' ın β -glukan yapısı monosit fonksiyonlarını doğrudan baskılayarak T hücre fonksiyonlarını dolaylı yoldan inhibe etmektedir ⁶⁰.

C. albicans ile infekte fare mononükleer hücreleri ile infekte olmayan kontrol grubu fare mononükleer hücrelerinden salınımını incelediğimiz diğer bir sitokin olan IL-6 düzeylerinin, özellikle LPS uyarımı olan hücrelerde infekte grupta kontrol grubuna göre azalma gösterdiği ve sonuçların yukarıda bahsedilen çalışmalarla benzer olduğu belirlenmiştir. Azalma düzeyleri sadece LPS ile uyarılmış kontrol grubu hücreleri ile *C. albicans* ile infekte hücreler arasında 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

T lenfositlerinden (Th1) ve NK hücrelerinden salınan IL-2' nin tüm bağışıklık sistemi üzerinde arttırıcı bir etkisi bulunmaktadır. IL-2' nin aksine aktive Th2 hücrelerinden salınan IL-4, IFN- γ 'nın hücre sel bağışıklıktaki etkilerini azaltıcı rol oynar ^{7,8}.

Grazziutti ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada insan PBMC'lerinin *Aspergillus* ve *C. albicans*' a karşı cevabı invitro olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubu olarak seçilen sağlıklı gruba ısı ile öldürülmüş *Aspergillus* konidiası verilerek bu grubun % 85'inde yanıt

gelişmiştir ancak tam tersi yönde *C. albicans*' a karşı bütün vericilerde yanıt oluştuğu görülmüştür. *Aspergillus* konidiaları ile MNC' lerin birleştirildiği kültür üst sıvılarında IFN- γ , TNF- α ve IL-2 seviyelerinde artış, IL-10 ve IL-4 düzeylerinde ise herhangi bir değişimin olmadığı uyarılmamış hücreler ile karşılaştırılarak gösterilmiştir. *Aspergillus*, lenfositlerin adezyon ve aktivasyon ile ilgili yüzey moleküllerinin ifadenmesini uyarmaktadır. Bu sonuçlar lenfositlerin *Aspergillus* ve *C. albicans*' a karşı gelişen konak cevabında Th1 tip cevabı ile katkıda bulunduğunu göstermektedir ⁵⁹.

Yaptığımız çalışmada gruplar arasında düzeyleri karşılaştırılan sitokinlerden IL-2, 24. saatte LPS ile uyarılmış ve uyarılmamış hücrelerde *C. albicans* ile infeksiyonda anlamlı düzeylerde artış göstermiştir. Ancak 24.saatli takiben 48. ve 72. saatlerde uyarılmış ve uyarılmamış hücrelerde infekte grupta anlamlı düzeyde bir artış göstermemiştir ($p<0.05$).

Çalışmamızda, IL-4 düzeyleri genel olarak çok belirgin bir değişiklik göstermemiştir. Ancak, IL-4 düzeyleri, 48 ve 72. saatlerde LPS ile uyarılmış hücrelerde infeksiyonu takiben belirgin olarak istatistiksel düzeylerde anlamlı azalma göstermiştir ve sonuçların yukarıda bahsedilen çalışmalarla benzer olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).

Sitokin sentezi inhibitörü olan IL-10, Th2 hücreleri, B lenfositleri ve makrofajlar tarafından antijen ile uyarıldıktan sonra geç dönemde salgılanır. Th1'lerin üreteceği IL-2 ve INF- γ yapımını baskılayarak bağışık yanıtın Th2 yönünde gelişmesine neden olur ²⁰.

Spellberg ve ark. yaptıkları çalışmada, kandidozlu fare modelinde konak yaşamı ile böbrek ve dalak bağışıklık yanıtının 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 invivo koşullarda Th2 özellikle de IL-10 yanıtını artırdığını göstermektedir⁵⁸.

Netea ve ark., invitro ve invivo deneylerde, maya hücre duvarında bulunan mannan, glukon ve kitin gibi antijenik özellik taşıyan komponentlerin tanınmasında ve yok edilmesinde TLR2 ve TLR4'ün etkin bir şekilde rol oynadığını göstermişlerdir. Sitokin seviyelerine bakıldığında ise; TNF- α , IFN- γ gibi proinflatuvar sitokinlerin infeksiyonla arttığını, buna karşın IL-10 seviyesinin de azaldığı bildirmişlerdir⁵².

Brieland 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 antiinflatuvar sitokinlerden IL-10'un azaldığı belirlenmiştir. İnfeksiyon tablosunun ilerleyen dönemlerinde ise Th2 grup sitokin ifadenmesi artış gösterirken, Th1 grubu sitokinlerde düşüş gözlenmiştir. TNF- α , IFN- γ , IL-12 gibi proinflatuvar sitokinlerin neden olduğu fagositik aktivite ile, *Candida* infeksiyonuna karşı konağın savunmasında anahtar rol aldıkları, IL-10 gibi antiinflatuvar sitokinlerin fagositik hücrelerin efektör mekanizmalarını baskılayarak infeksiyona karşı oluşturulan Th1 bağışık yanıtını ortadan kaldırdığı ve infeksiyona duyarlılığı artırdığı bildirilmiştir⁵³.

Roilides ve ark. mononükleer hücreler ile *Candida* hücrelerini invitro olarak birleştirdiklerinde, mayaya karşı mononükleer hücreler tarafından oluşturulan antifungal etkinin IL-10 ile baskılandığını göstermiştir. Böylece vücuda giren antijenlere karşı geliştirilen antiinflatuvar yanıtın düzenlendiğini bildirilmişlerdir^{54,55}.

Çalışmamızda *C. albicans* fare modelinden elde edilen hücrelerde infekte olmayan kontrol grubu farelere ait hücrelerle kıyaslandığında IL-10 sitokin düzeylerinin 24. saatte anlamlı olmayan düzeylerde artış gösterirken, 48 ve 72. saatlerde LPS ile uyarım sonrası infekte hücrelerde

istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde azalma gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$).

C. albicans' ın sistemik infeksiyonlarında farelerdeki duyarlılık ve direnç Th1 ve Th2 cevaplarının dengesi ile ilişkilidir. Scappelo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, mantarla infekte edilen farelerde TGF- β ' nın üretiminin arttığı görülmüştür. TGF- β ' nın serolojik olarak azalması kazanılmış bağışıklığın gelişimine son verir ve bu durum IL-12/IFN- γ ' nın bozulmuş üretimi ile sonuçlanmaktadır. Tekrar maya infeksiyonu olduğunda IL-4 ve IL-10' nun ifadenmesi artmaktadır. IFN- γ ' nın aktive ettiği makrofajların kandidisidal fonksiyonu invitro TGF- β ile sağlanmaktadır. İn vivo koşullarda *Candida* infeksiyonu ile artan Th1 hücre farklılaşmasında IFN- γ ve IL-12' nin rolü olduğu bilgisine ek olarak TGF- β ' nın kandidisidal direncin uzun sürmesinde ve optimal Th1 yanıtın gelişmesinde gerekli olduğunu gösterilmiştir ⁵⁶.

Kazanılmış bağışıklıkta Th1/Th2 dengesi *Candida* infeksiyonunun patogenezinin anlaşılmasında gereklidir. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda *Candida* infeksiyonları konağın yaşamı açısından risk oluşturur.

Farelerde *C. albicans* infeksiyonuna karşı direnç Th1 hücre yanıtı ile sağlanmaktadır. Th1 hücreleri tarafından salgılanan sitokinler makrofajları ve nötrofilleri *Candida*' yı yok etme yönünde uyarmaktadır. Th2 yanıtının gelişmesi konağın infeksiyona duyarlılığını gösterir. Çünkü Th2 hücrelerinin salgıladığı sitokinler Th1 yanıtın gelişimini inhibe eder ve fagositik efektör hücreleri etkisizleştirir. Doğal ve kazanılmış T hücre bağışıklığı arasındaki çapraz etkilerin tanınması infeksiyona karşı oluşturulan yanıt mekanizmalarını açığa çıkaracaktır ^{27,33,36}.

Th1 sitokinleri *C. albicans* infeksiyonuna direncin fagositik mekanizmalarını arttırırken Th2 sitokinlerin zayıflatmaktadır. Bununla birlikte hücrenin mukozal ya da sistemik seviyede direncin oluşması için hücre düzeyinde farklılıklar olabilir. İlerlemiş *Candida* infeksiyonlarında

(örneğin; HIV enfeksiyonu gibi bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda) Th1 hücrelerinden ziyade Th2 hücrelerinin cevabı daha önemlidir^{33,36}.

Kronik mukokutanöz kandidoz, deri, tırnak ve mukoz membranların ilerleyici ve tekrar eden *Candida* enfeksiyonları ile karakterize kompleks bir bozukluktur. Kronik mukokutanöz kandidozlu (CMC) hastalarda yapılan çalışmalarda Lilic ve ark., IL-6 ve antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 seviyelerinin arttığını, IL-12 ve IL-2 seviyesinin düştüğünü, TNF- α , IL-4 ve IL-5 seviyelerinde çok önemli bir değişimin görülmediğini ve ilginç olarak da IFN- γ 'nın neredeyse yok denecek kadar az olduğunu saptamışlardır. IL-12 ve IFN- γ 'nın da kandidozun vücuttan atılımı ve Th1 yanıtına yardımcı olduğu bilinmektedir. Mantarlara karşı koruyucu görev yapan Th1 yanıtının bu tür hastalarda bozuk olması, enfeksiyonun ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. Ayrıca antiinflamatuvar sitokinlerin (IL-10 gibi) artışının, Th1 yanıtını baskılaması nedeniyle kandidoza karşı duyarlılığı arttığı bildirilmiştir. Bu hastalarda düşük düzey Th1 ve yüksek düzey Th2 sitokin paterni mevcuttur⁵⁷.

T hücre yanıtı *C. albicans*' a karşı bağışık yanıtın başlatılmasında ve sürdürülmesinde kritiktir. Temel olarak Th1/Th2 dengesi ilk olarak Th1 yanıtı ve fagosite bağımlı bağışıklığın sürdürülmesi arasında bir ilişkiyi gerektirir. Bu ilişki mantar enfeksiyonuna engel olmada veya enfekte edilmiş dokudan patojenik mantarı temizlemede ve Th1\Th2 yanıtın düzenlenmesinde önemlidir^{33,36}.

Bu çalışmalar ışığında, enfeksiyonlar sırasında Th1 yanıtı ile Th2 yanıtı arasında karşılıklı bir etkileşimin olduğu anlaşılmaktadır. Th1 yanıtı enfeksiyonun erken dönemleri ile artış gösterirken, Th2 yanıtının oluşması ile birlikte Th1 yanıtı baskılanmaktadır. Bizim çalışmamızda da IL-2 (24. saatte anlamlı artışı), TNF- α , IFN- γ ve IL-1 β salınımına bağlı olarak artan Th1 yanıtı; IL-4, IL-6 ve IL-10 salınımının azalmasına bağlı olarak baskılanmış Th2 yanıtı gözlenmiştir. Bu verilere dayanarak oluşturulan enfeksiyon modelinde akut inflamatuvar cevabın enfeksiyonun başlangıç

döneminde artış gösterdiği, buna bağlı olarak da kronik inflamatuvar cevabın bu dönemde baskılandığı görülmüştür.

7. SONUÇ

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

KAYNAKLAR

- 1- Edwards J.E. *Candida* Species. In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th edition. New York: Churchill Livingstone; 1995. 2289-2305.
- 2- Tümbay E. *Candida* Türleri. İçinde: Ustaçelebi Ş., editörler. Temel ve klinik mikrobiyoloji. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. 1081-1086.
- 3- Özbal Y., Temel İmmünoloji, 2. baskı, İstanbul: Nobel tıp kitabevleri; 2000.
- 4- Abbas A.K., Lichtman A.H., editors. Cellular and molecular immunology, 5 th ed., Philadelphia, Saunders, 2003.
- 5- Bilgehan H., Temel mikrobiyoloji ve bağışıklık bilimi. 10.baskı. İzmir: Barış yayınları; 2002.
- 6- Yücel A. Bakteri, Parazit ve Funguslara Karşı İmmun Yanıt. İçinde: Ustaçelebi Ş., editörler. Temel ve klinik mikrobiyoloji. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. 267-289.
- 7- Kılıçturgay K., İmmünoloji. 3 baskı. Bursa: Nobel&Güneş yayınevi; 2003
- 8- İmir T. İmmunoloji. İçinde: Ustaçelebi Ş., editörler. Temel ve klinik mikrobiyoloji. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. 119-166.
- 9- John E, Edwards JR. *Candida* species. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and

- Practise of Infectious Diseases. 5th edition. Pennsylvania, Churchill Livingstone 2000; 2656-2674.
- 10-Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., editors. Microbiology. Fourth edition. Singapore, McGraw-Hill Companies; 1999: 818-820.
- 11-Yücel A, Kantarcıoğlu A.S. Pathogenicity determinants of *Candida*. Cerrahpaşa J Med 2000; 31(3):172-186.
- 12-Vazquez J. A., Sobel J. D. Candidiasis. In: Dismukes W. E., editors. Clinical mycology. Oxford: Oxford University Press; 2003. 143-187.
- 13-Kwon-Chung K.J., Bennett J. E. Medical Mycology. Philadelphia, Lea and Febinger, 1992; 280-336.
- 14-Aydın M. *Candida* Cinsi Mantarlar. İçinde: Mısırlıgil C. Tıp ve Diş Hekimliğinde Mikrobiyoloji. 3.baskı. Ankara: Güneş yayınevi; 2004. p.1109-17
- 15-Kuştimur S. *Candida*' da virulans faktörler. I. Ulusal Mantar hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (4-6 Mayıs 1999, İzmir). Tutanaklar 1999; 145-150.
- 16-Ghannoum M.A., Abu Elteen K.H.. Pathogenicity determinants of *Candida*. Mycoses 1990; 831-839.
- 17-Douglas J.L. The surface layers of *Candida albicans* and their relevance to pathogenicity. İçinde: Surface Structures of Microorganisms and Their Interactions with the Mammalian Host. 1988; 155-163

- 18-Segal E., Soroka A, Schechter A. Correlative relationship between adherence of *Candida albicans* to human vaginal epithelial cells in vitro and candidal vaginitis. *Sabouradia* 1984; 22: 191-200
- 19-Wellmer A., Bernhardt H. Adherence on buccal epithelial cells and germ tube formation in the continuous flow culture of clinical *Candida albicans* isolates. *Mycoses* 1997; 40: 363-368.
- 20-Mencacci A., Cenci E., Bacci A., Montagnoli C., Bistoni F., Romani L. Cytokines in Candidiasis and Aspergillosis . *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2000; 1, 235-251.
- 21-Vazquez -Torres A., Balish E. Macrophages in Resistance to Candidiasis. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* 1997; 61(2): 170-192.
- 22-Hayden R. T. (Dolapçı İ.) İn Vitro Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri. İçinde: Persing D. H., Tenover F. C., Versaloviç J., Tang Y., Unger E. R., Relman D.A., White T. J., editors. *Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar*. 1. baskı. Ankara: Palme Yayınevi; 2006. 43-69.
- 23-Romani L. Overview of the fungal pathogens. In: Kauffmann H. E., Sher A., Ahmed R., editors. *Immunology of infectious diseases*, Washington: ASM Press; 2003, 25-37.
- 24-Herring A.C., Huffnagle G.B. Innate immunity and fungal infections. In: Kauffmann H. E., Sher A., Ahmed R., editors. *Immunology of infectious diseases*. Washington: ASM Press; 2003, 127-137.

- 25-Casadevall A. Acquired immunity against fungi. In: Kauffmann H. E., Sher A., Ahmed R., editors. Immunology of infectious diseases, Washington: ASM Press; 2003. 223-234.
- 26-Roitt I., Brostoff J., Male D. Immunology. 4.baskı. London: Mosby; 1996. 17,12.
- 27- Marodi L., Schreiber S., Anderson D. C., MacDermott R. P., Korchak H. M., Johnston R. B. Enhancement of Macrophage Candidacidal Activity by Interferon- γ Increased Phagocytosis, Killing, and Calcium Signal Mediated by a Decreased Number of Mannose Receptors. J. Clin. Invest. 1993; 91: 2596-2601.
- 28- Çırak M. Y., Kalkancı A., Kuştımur S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2003; 98: 1027-1032.
- 29- Shoham S., Levitz S. The immune response to fungal infection. Br J Haematol 2005; 129: 569-582
- 30- Mullick A., Leon Z., Min-Oo G., Berghout J., Lo R., Daniels R., Gros P. Cardiac Failure in C5-Deficient A/J Mice after *Candida albicans* Infection. Infection And Immunity 2006 ; 74(8): 4439-4451.
- 31-Dongari-Bagtzoglou A., Fidel P.L. The Host Cytokine Responses and Protective Immunity in Oropharyngeal Candidiasis. J Dent Res 2005; 84 (11): 966-977.
- 32-Murciano C., Villamoín E., O'Connor J., Gozalbo D., Gil M.L. Killed *Candida albicans* Yeasts and Hyphae Inhibit Gamma Interferon Release

by Murine Natural Killer Cells. *Infection And Immunity* 2006; 74(2): 1403-1406.

33- Romani L. Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 68: 175-179.

34-Dignani M. C., Solomkin J. S., Anaissie E. J. *Candida*. In: Anaissie E. J., editors. *Clinical mycology*. New York: Churchill Livingstone; 2003. 195-239.

35-Vazquez J. A., Sobel J. D. Candidiasis. In: Dismukes W. E., editors. *Clinical mycology*. Oxford: Oxford University Press; 2003. 143-187.

36- Romani L. Immunity to *Candida albicans* :Th1,Th2 cells and beyond. *Current Opinion in Microbiology* 1999; 2: 363-367.

37-Ashman R. B., Papadimitriou J. M., Production and Function of Cytokines in Natural and Acquired Immunity to *Candida albicans* *Infection Microbiological Reviews* 1995; 59(4): 646-672.

38- Takeda K., Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 2005, 17(1): 1-14.

39-Ellepola A. N. B., Morrison J. C. Laboratory Diagnosis Of Invasive Candidiasis. *The Journal Of Microbiology* 2005; 43(S): 65-84.

40- Horvath L. L., George B. J., Murray C. K., Harrison L. S., Hospenthal D. R. Direct Comparison Of The BACTEC 9240 And BacT/ALERT 3D Automated Blood Culture Systems For *Candida* Growth Detection. *Journal Of Clinical Microbiology* 2004; 42(1): 115-118.

41-Berenguer J., Buck M., Witebsky F., Stock F., Pizzo P. A., Walsh T. J. Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of tissue-proven invasive candidiasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 17(2); 103-109.

42-Toubas D., Essendoubi M., Adt I., Pinon J. M., Manfait M., Sockalingum G. D. FTIR Spectroscopy In Medical Mycology: Applications To The Differentiation And Typing Of *Candida*. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387: 1729-1737.

43-Ponton J., Moragues M. D., Quindos G. Non-Culture-Based Diagnostics. In: Calderone R. A., editors. *Candida and Candidiasis*, 1st ed. Philadelphia: ASM Press; 2002. 395-441.

44-Yıldıran Ş. T. *Aspergillus*'a karşı doğal bağışıklık; Th1/Th2 dengesi. İçinde: Ener B., editörler. *Aspergillus*. 1.baskı. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, Klimik; 2006. 103-109.

45- Luo G., Mitchell T.G. Rapid Identification Of Pathogenic Fungi Directly From Cultures By Using Multiplex PCR. *Journal Of Clinical Microbiology* 2002; 40(8): 2860-2865.

46-Kalkancı A., Kuştimur S., *Candida albicans* Hücre Duvar Yapıları. *İnfeksiyon Dergisi* 1999; 13(3): 467-471.

47- Dignani M. C., Solomkin J. S., Anaissie E. J. *Candida*. In: Anaissie E. J., editors. *Clinical mycology*. New York: Churchill Livingstone; 2003. 195-239.

48- Pietro P, Hussell T, Openshaw J.M. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immun Meth* 2000; 243: 107-124.

- 49-Dürdal U.. Serolojik Tanı Yöntemleri. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları; 2006. 33-39
- 50- Aybay C. İmmunolojik Teknikler. İçinde: Ustaçelebi Ş., editörler. Temel ve klinik mikrobiyoloji. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. 325-336.
- 51-Lequin R. Enzyme Immunoassay (EIA)/ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Clin chem 2005; 51(12): 2415-2418.
- 52-Netea M.G., Van Der Graaf C.A. Vonk A.G., Verschueren I., Van Der Meer J.W., Kullberg B.J.. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. J Infect Dis. 2002; 185(10):1483-9.
- 53- Brieland J, Essig D, Jackson C, Frank D, Loebenberg D, Menzel F. Comparison of Pathogenesis and Host Immune Responses to *Candida glabrata* and *Candida albicans* in Systemically Infected Immunocompetent Mice. Infect and Immun 2001; 69(8): 5046-5055.
- 54- Roilides E., Anastasiou-Katsiardani A., Dimitriadou-Georgiadou A., Kaditsoglou I., Tsaparidou S., Panteliadis C., Walsh T.J. Suppressive Effects of Interleukin-10 on Human Mononuclear Phagocyte Function against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. The Journal of Infectious Diseases 1998; 178: 1734-1742.
- 55-Levitz S. M, Tabuni A., Nong S., Golenbock D. T. Effects of Interleukin-10 on Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Responses to *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and Lipopolysaccharide. Infection And Immunity 1996; 64(3): 945-951.

56-Spaccapelo R, Romani L, Tonnetti L, Cenci E, Mencacci A, Del Sero G, Tognellini R, Reed SG, Puccetti P, Bistoni F. TGF-beta is important in determining the in vivo patterns of susceptibility or resistance in mice infected with *Candida albicans*. J Immunol. 1995; 155(3): 1349-60.

57-Lilic D., Gravenor I., Robson N., Lammas D.A., Drysdale P., Calvert J. E., Cant A. J., Abinun M. Deregulated Production Of Protective Cytokines In Response To *Candida albicans* Infection In Patients With Chronic Mucocutaneous Candidiasis. Infection And Immunity 2003; 71(10): 5690-5699.

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

59-Grazziutti ML, Rex JH, Cowart RE, Anaissie EJ, Ford A, Savary CA. Aspergillus fumigatus conidia induce a Th1-type cytokine response. J Infect Dis. 1997; 176(6):1579-83.

60- Nakagawa Y, Ohno N, Murai T. Suppression by *Candida albicans* Beta-Glucan of Cytokine Release from Activated Human Monocytes and from T Cells in the Presence of Monocytes. J Infect Dis 2003; 187: 710-713.

61- Farah C, Elahi S, Pang G, Gotjamanos T, Seymour J, Clancy R, et al. T Cells Augment Monocyte and Neutrophil Function in Host Resistance against Oropharyngeal Candidiasis. Infect and Immun 2001; 69(10): 6110-6118.

62-Kaposzta R, Tree P, Marodi L, Gordon S. Characteristics of Invasive Candidiasis in Gamma Interferon-and Interleukin-4-Deficient Mice: Role of Macrophages in Host Defense against *Candida albicans*. *Infect and Immun* 1998; 66(4): 1708-1717.

63- 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.

64-Almeida S, Lopes J. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 529-537.

65-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 candidosis. *Microbiology*. 2004; 150(9): 2807-2813

66- Gaforio J. J., Ortega E., Algarra I., Serrano M. J., Cienfuegos G.A. NK Cells Mediate Increase of Phagocytic Activity but Not of Proinflammatory Cytokine (Interleukin-6 [IL-6], Tumor Necrosis Factor Alpha, and IL-12) Production Elicited in Splenic Macrophages by Tilorone Treatment of Mice during Acute Systemic Candidiasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002; 9(6): 1282-1294.

67-Aybay C, Imir T. Tumor necrosis factor (TNF) induction from monocyte/macrophages by *Candida* species. *Immunobiology*. 1996; 196(4): 363-74.

68-Louie A, Baltch AL, Franke MA, Smith RP, Gordon MA. Comparative capacity of four antifungal agents to stimulate murine macrophages to

produce tumour necrosis factor alpha: an effect that is attenuated by pentoxifylline, liposomal vesicles, and dexamethasone. J Antimicrob Chemother 1994; 34(6): 975-87.

69- Louie A., Baltch A. L., Smith R. P., Franke M. A., Ritz W. J., Singh J. K., Gordon M. A. Tumor Necrosis Factor Alpha Has A Protective Role In A Murine Model Of Systemic Candidiasis. Infection And Immunity 1994 ; 62(7): 2761-2772.

70-Valdez JC, Mesón DE, Sirena A, de Petrino SF, Eugenia M, de Jorrat BB, de Valdez MG. Induction of the immune response suppression in mice inoculated with *Candida albicans*. Mycopathologia. 1986; 93(3): 147-50.

71-Badiee P, Kordbacheh P, Alborzi A, Malekhoseini S, Zeini F, Mirhendi H, Mahmoodi M. Prospective screening in liver transplant recipients by panfungal PCR-ELISA for early diagnosis of invasive fungal infections. Liver Transpl. 2007; 13(7): 1011-6.

72-Lain A., Elguezabal N., Brena s., Carlos J., Palacia A., et all. Diagnosis of invasive candidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay using the N-terminal fragment of *Candida albicans* hyphal wall protein. Bio Med. 2007; 7(35): 1-11.

73- 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 Immunol. 1988;18(7): 1143-1146.

11. ÖZGEÇMİŞ

BERNA ERDAL

Doğum Tarihi : 06.05.1981
Doğum Yeri : Ankara
Meslek : Biyolog
Yazışma Adresi : Gördük Sok. No:7/8 Abidinpaşa Mamak/ Ankara

E-mail : bernaerdal@hotmail.com

EĞİTİM

2005-2007 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümü Yüksek Lisansı
1999-2004 Hacettepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
1997-1999 Başkent Lisesi
1996-1997 Keçiören Süper Lisesi
1993-1996 29 Ekim Ortaokulu
1988-1993 Abidinpaşa İlkokulu

YABANCI DİL

İngilizce