

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

***CANDIDA* TÜRLERİ ÜZERİNE BİR BORİK ASİT ANALOĞU
OLAN Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)₂ (ZL₃B)'NİN İN-VİTRO
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Emel UZUNOĞLU

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Teoman Murat ÖZSAN**

ANKARA-2012

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

***CANDIDA* TÜRLERİ ÜZERİNE BİR BORİK ASİT ANALOĞU
OLAN Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)₂ (ZL₃B)'NİN İN-VİTRO
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Emel UZUNOĞLU

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Teoman Murat ÖZSAN**

ANKARA- 2012

**Bu proje Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü
tarafından 10B3330025 sayı ile desteklenmiştir.**

KABUL VE ONAY

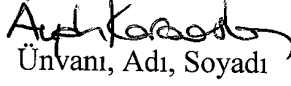
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim/Bilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

Candida Türleri Üzerine Bir Borik Asit Analogu Olan Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)₂(ZL₃B)'nin İn-Vitro Etkinliğinin Araştırılması başlıklı, Dr.Emel UZUNOĞLU'na ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

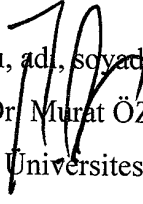
Tez Savunma Tarihi: 09/02/2012


Ünvanı, Adı, Soyadı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Aydın KARAARSLAN Anabilim/Bilim Dalı Başkanı

Jüri Başkan

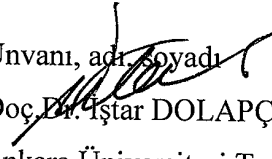

Ünvanı, adı, soyadı

Prof. Dr. Murat ÖZSAN

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim/Bilim Dalı

Tez Danışmanı


Ünvanı, adı, soyadı

Doç. Dr. İftar DOLAPÇI

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim/Bilim Dalı

Üye

ÖNSÖZ

Hızla artan ilaç direnci problemi nedeniyle, azollere dirençli *Candida* türleri tedavide önemli bir sorun haline gelmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların, Borik asit ve türevlerinin anti-fungal etkinliklerinin ve etki mekanizmalarının aydınlığa kavuşturulmasında ışık tutacağına, bu durumun özellikle azol dirençli, vulvovajinal kandidoz olgularında yeni bir tedavi yaklaşımı sağlayacağına ve ek olarak, borik asit analoglarının tıpta kullanımına dikkat çekilmesi ile uzun vadede yaygın bor kullanımı aracılığıyla, ülke ekonomisine katkı sağlayacağına inanmaktayım.

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince, her konuda bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, desteği ve yardımları ile her zaman bana ışık tutan değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Teoman Murat Özsan ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Aydın Karaarslan'a, eğitimim boyunca bilgisini ve anlayışını benden esirgemeyen, başta Doç. Dr. İştah Dolapçı, Doç Dr. Zeynep Ceren Kip Karahan ve Uzm. Dr. Gülay Aral Akarsu olmak üzere Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli Öğretim Üyelerine,

Çalışmam süresince material toplamam konusunda bana yardımcı olan Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı sorumlusu Sayın Prof. Dr. Derya Aysev'e, sorumlu biyolog ve laborantlarına,

Birlikte uyum içinde çalışmaktan keyif aldığım Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görevli Asistan arkadaşlarım ve Personeline,

Bu günlere gelmemde gösterdikleri özveri, sabır, anlayış ve tüm zor zamanlarımda desteklerini benden esirgemeyen ailem ve her an varlığını yanımda hissettiğim sevgili babam Ali Uzunoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Emel Uzunoğlu

Ankara-2012

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. TARİHÇE.....	4
2.2. MANTARLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ	4
2.3. <i>CANDIDA</i> KÖKENLERİNİN MORFOLOJİSİ	6
2.4. ANTİJENİK YAPI	8
2.5. <i>CANDIDA</i> KÖKENLERİNİN VİRÜLANS FAKTÖRLERİ.....	8
2.5.1. Adezyon	8
2.5.2. Dimorfizm.....	9
2.5.3. Yüzey Hidrofobisitesi	9
2.5.4. Hücre Duvarı.....	10
2.5.5. Fenotipik Değişim.....	10
2.5.6. Toksinler	11
2.5.7. Enzimler	11
2.5.7.1. Hemolizin Enzimi.....	11
2.5.7.2. Salgısal Asit Proteinaz Enzimi (SAP).....	11
2.5.7.3. Fosfolipaz Enzimi.....	13
2.5.7.4. Esteraz Enzimi.....	13
2.5.8. Biyofilm oluşumu	14
2.6. FUNGAL PATOGENEZ	16
2.6.1. Etken-Konak İlişkisi	17
2.6.2. Bağışıklık	17
2.7. VULVOVAJİNAL KANDİDOZ (VVK).....	19

2.7.1. Etiyoloji	20
2.7.2. Epidemiyoloji ve Patogenez	21
2.7.3. Tanı	22
2.7.4. Tedavi	23
2.8. <i>CANDIDA</i> ENFEKSİYONLARININ TANISI	24
2.8.1. Mikroskopik İnceleme	24
2.8.2. Kültür	25
2.8.3. Seroloji.....	26
2.8.4. Nükleik asit Amplifikasyon Teknolojileri	28
2.8.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	28
2.8.4.2. Sekanslama (Dizi Analizi)	28
2.8.5. Sinyal Amplifikasyon Teknolojileri	29
2.9. OTOMATİZE SİSTEMLER	29
2.10. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ.....	30
2.10.1. Makro ve Mikrodilüsyon Yöntemi	31
2.10.2. Kolorimetrik Yöntemler.....	31
2.10.3. E-Test.....	32
2.11. <i>CANDIDA</i> KÖKENLERİNDE ANTİFUNGAL İLAÇLAR VE DİRENÇ MEKANİZMALARI	33
2.11.1. Amfoterisin B ve Lipid Formülasyonları.....	33
2.11.2. Triazololler (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol).....	34
2.11.3. Antimetabolitler (Flusitozin)	35
2.11.4. Ekinokandinler (kaspofungin, mikafungin, anidulafungin).....	35
2.12. BOR MİNERALİ	35
2.12.1. Bor Ürünleri	36
2.12.2. Uygulama Alanları (Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü, 2011).....	37
2.12.3. Bor Madeninin Tıpta Kullanımı.....	39
2.12.3.1. Proteosom İnhibitörleri	40
2.12.3.2. Antikoagülanlar	41
2.12.3.3. Dipeptidil Peptidaz İnhibitörleri.....	41
2.12.3.4. INS (1,4,5) P ₃ Reseptör İnhibitörleri.....	42
2.12.3.5. Östrojen Analogları	42

2.12.3.6. Boron Nötron Yakalama Terapisi (BNCT).....	42
2.12.3.7. Mikrobiyolojideki Kullanımı	43
2.13.1. Apoptoz Mekanizmaları	45
2.13.2. Kaspazlar	46
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	48
3.1. <i>CANDIDA</i> KÖKENLERİ.....	48
3.2. ÇALIŞMAYA ALINAN KÖKENLERİN TANIMLANMASI.....	49
3.2.1. Germ Tüp Testi İle Tiplendirme	49
3.2.1.1. Gereçler	50
3.2.1.2. Yöntem.....	50
3.2.2. API 20C AUX Sistemi İle Tiplendirme	51
3.2.2.1. Gereçler	51
3.2.2.2. Yöntem	51
3.3. MISIR UNLU TWEEN 80 AGAR İLE TİPLENDİRME.....	52
3.3.1. Gereçler.....	52
3.3.1.1. Besiyerleri	52
3.3.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	53
3.3.1.3. Araçlar	53
3.3.2. Yöntem.....	53
3.4. MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİ İLE ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTİ	54
3.4.1. Gereçler.....	54
3.4.1.1. Antifungaller	54
3.4.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler.....	54
3.4.1.3. Araçlar	55
3.4.1.4. MİK Tayininde Kullanılan Solüsyonlar	55
3.4.1.5. Antifungal Stok Solüsyonları	56
3.4.1.6. İnokulum Solüsyonları	58
3.5. MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİ İLE ZL ₃ B'NİN ANTİFUNGAL DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ	59
3.5.1. Gereçler.....	59
3.5.1.1. Antifungaller	59

3.5.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler.....	60
3.5.1.3. Araçlar	60
3.5.1.4. MİK Tayininde Kullanılan Solüsyonlar	61
3.5.1.5. Antifungal Stok Solüsyonları	62
3.5.1.6. İnokulum Solüsyonları	64
3.6. OKSİDATİF METABOLİZMA TAYİNİ.....	65
3.6.1. Gereçler.....	65
3.6.1.1. Kimyasal Madde ve Malzemeler	65
3.6.1.2. Sarf Malzemeleri	65
3.6.1.3. Araçlar.....	65
3.6.2. Yöntem.....	67
3.7. BİYOFİLM DENEYLERİ	67
3.7.1. Gereçler.....	68
3.7.1.1. Besiyerleri	68
3.7.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	68
3.7.1.3. Araçlar.....	69
3.2.1.4. Yöntem.....	69
3.8. APOPTOZ DENEYİ	70
3.8.1 Gereçler.....	70
3.8.1.1. Besiyerleri	70
3.8.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	70
3.8.1.3. Araçlar.....	71
3.8.1.4. Jel Elektroferez İşleminde Kullanılan Solüsyonlar.....	71
3.8.2. Yöntem.....	72
3.9. İSTATİSTİK İNCELEME	72
4. BULGULAR.....	73
4.1. <i>CANDIDA</i> KÖKENLERİ	73
4.2. <i>CANDIDA</i> KÖKENLERİNİN FLUKONAZOL ve AMFOTERİSİN B ile YAPILAN ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ.....	73
4.3. <i>CANDIDA</i> KÖKENLERİNİN ZL ₃ B İLE YAPILAN ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ.....	74
4.4. OKSİDATİF METABOLİZMA TESTİ	77

4.5. ZL ₃ B'nin GERM TÜP, GERÇEK ve YALANCI HİF OLUŞUMUNA ETKİSİ	78
4.6. ZL ₃ B'NİN BİYOFİLM OLUŞUMUNA ETKİSİ.....	80
4.7. ZL ₃ B'NİN APOPTOZ ETKİSİ	81
5. TARTIŞMA	82
6. SONUÇLAR	88
ÖZET.....	90
SUMMARY	91
KAYNAKLAR	92

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	: American Type Culture Collection
BNCT	: Boron Neutron Capture Therapy
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
D	: Dirençli
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DBD	: Doza Bağlı Duyarlı
EPS	: Extracellular Polymeric Substance
FDA.....	: Food and Drug Administration
Ig	: İmmüoglobulin
MİK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
µg	: Mikrogram
µM	: Mikromolar
MOPS	: Morfolinpropansülfonik asit
NCCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standards
OH	: Orta hassas
PMNL	: Polimorf Nüveli Lökosit
PZR	: Polimeraz Zincir reaksiyonu
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
H	: Duyarlı
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
SAP	: Salgısal asit proteinaz
VVK	: Vulvovajinal kandidoz
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 2.1. Mantarların Sınıflandırılması	6
Tablo 2.2. Bazı Önemli <i>Candida</i> Türlerinin Önemli Kimyasal (Asimilasyon) Özellikleri.....	7
Tablo 2.3. Serolojik Testlerin Duyarlılık ve Özgüllük Oranları.....	27
Tablo 2.4. <i>Candida</i> Türlerinin Antifungal Duyarlılıkları.....	30
Tablo 2.5. CLSI'e Göre MIK Değerleri	32
Tablo 4.1. İzole Edilen <i>Candida</i> Türleri	73
Tablo 4.2. <i>Candida</i> Kökenlerinin Duyarlılık Durumları	74
Tablo 4.3. <i>Candida</i> Kökenlerinin ZL ₃ B Duyarlılık Durumları	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1. Apoptozis yolları	47
Şekil 3.1. Hastaların yaşlara göre dağılım oranları	48
Şekil 4.1. 25 µg/ml ZL ₃ B ile yapılan antifungal duyarlılık testi sonucu.....	76
Şekil 4.2. 50 µg/ml ZL ₃ B yapılan antifungal duyarlılık testi sonucu.....	76
Şekil 4.3. 100 µg/ml ZL ₃ B yapılan antifungal duyarlılık testi sonucu.....	77
Şekil 4.4. ZL ₃ B'nin oksidatif metabolizmaya etkisi.....	78
Şekil 4.5. 25 µg/ml konsantrasyonda ZL ₃ B'nin <i>C. albicans</i> ATCC 90028'in hif oluşumuna etkisi	78
Şekil 4.6. 25 µg/ml konsantrasyonda ZL ₃ B'nin <i>C. krusei</i> ATCC 6258'in hif oluşumuna etkisi.....	79
Şekil 4.7. 25 µg/ml konsantrasyonda ZL ₃ B'nin <i>C. albicans</i> ATCC 90028'in germ tüp oluşumuna etkisi	79
Şekil 4.8. ZL ₃ B'nin' nin oksidatif metabolizma ve biyofilm üzerine etkisi	80
Şekil 4.9. ZL ₃ B'nin apoptoz etkisi	81

1. GİRİŞ

Bor önemli bir endüstriyel hammaddedir. Balıkesir, Bursa, Eskişehir ve Kütahya illerine dağılmış olan bor yatakları, dünyanın şu ana kadar bilinen en büyük rezervidir. Dünyanın toplam bor rezervlerinin 1,2 milyar ton olduğu tahmin edilmekte ve rezervlerin %63'ü Türkiye'de bulunmaktadır. Buna karşın, hem üretimde hem de ekonomik bazda Türkiye'nin aldığı pay, rezervleriyle orantılı değildir. Bu nedenle Türkiye bor cevherini stratejik maden olarak ilan etmiştir (www.boren.gov.tr).

Kullanım alanları arasında; cam, seramik, nükleer, elektrik-elektronik ve bilgisayar sanayileri; iletişim araçları; inşaat-çimento, metalürji ve enerji sektörleri; otomobil sanayi; tekstil sektörü; kimya, temizleme ve beyazlatma sanayileri; tarım sektörü; kâğıt sanayi; fotoğrafçılık; kompozit malzemelerin ve spor malzemelerinin üretimi; manyetik cihazlar ve mumyalama bulunur (Özpeker, 2001).

Ayrıca, ilaç ve kozmetik sanayi (dezenfektanlar, antiseptikler ve diş macunlarının üretimi) ve tıpta da kullanım alanları vardır. Osteoporoz, alerjik hastalıklar, psikiyatrik hastalıklar, artrit ve menopozun tedavisinde, kafa içi tümörlerinin tanısında, multiple myelom tedavisinde, enfeksiyon hastalıklarının tanı ve tedavisinde yer alır (Özpeker, 2001).

Bor, periyodik tabloda B simgesi ile gösterilen, atom numarası 5, atom ağırlığı 10,81 olan metalle ametal arası yarı iletken özelliğe sahip bir elementtir (Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü, 2011). Bor madeninin şu anda tıpta kullanılan tek formu borik asit ve tuzlarıdır (Groziak, 2001).

Borik asit esterlerinin, mikroorganizmalara ait pek çok esansiyel enzimi inhibe ettikleri gösterilmiştir. Gram-negatiflerde bulunan, DNA methyltransferase ve gram-pozitiflerde bulunan menaquinone methyltransferase, *HIV-1* protease, *Streptomyces griseus*'a ait NAD-glycohydrolase ve ADP-ribosyltransferase başlıca örneklerdir (Groziak, 2001).

β -laktam antibiyotiklere karşı direçten sorumlu β -laktamaz enzimleri aktif bölgelerinde serin rezidüleri içerir ve boronik asitlerin potansiyel hedefleridirler. Şu ana kadar *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Esherichia coli*, *Citrobacter diversus* β - laktamazlarına karşı etkili borik asit esterleri elde edilmiştir. Borik asit esterleri sayesinde E. coli'ye ait TEM-1 ve AmpC β -laktamazlarının x-ray kristal yapıları çözülmüştür (Groziak, 2001).

Borik asit esterleri, benzadiazaborin enoyl acyl carrier protein redüktaz (ENR) enzimini inhibe eder. Bu enzim NAD(P)H bağımlıdır ve yağ asidi sentezindeki son basamağı katalizler. ENR'nin moleküler hedefi triklosan ve izoniazid ile çok benzerdir (Groziak, 2001).

Bu enzim inhibitörleri dışında doğadan elde edilmiş, bor minerali içeren, makrolid grubuna ait dört farklı antibiyotik bulunmaktadır (Boromycin, Aplasmomycin, Borophycin, Tartrolon). Ancak bu antibiyotikler, memeli hücrelerine toksik oldukları için henüz kullanım alanı bulamamışlardır (Soloway, 1998).

Vulvovajinal candidoz, dünyadaki en yaygın kadın sağlığı problemidir. Doğurganlık çağındaki kadınlarda, %20–30'lu oranlarla, en sık görülen üç vajinal enfeksiyondan biridir. Epidemiyolojik çalışmalar kadınların %75'nin tüm hayatları boyunca en az bir kez, %40-50'sinin ise birden fazla vajinal candidoz atağı geçirdiğini göstermektedir. Yüksek prevelansı ve yaşam kalitesini düşürmesi nedeniyle önemli bir klinik problemdir. Bu enfeksiyonların %80-90'nından *Candida albicans* sorumludur. Bu mikroorganizmayı *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* ve *Candida krusei*, %5–10, %5 ve %1'lik oranlarla takip etmektedir. Prevelansları düşük olmasına rağmen, konvansiyonel antifungal ilaçlara dirençleri nedeniyle *non-albicans Candida* türleri bu hastalıkta önemli bir yere sahiptir. Azollü formülasyonlara yalnızca %50'lik bir kısmı cevap vermektedir. Ayrıca, hızla artan ilaç direnci problemi nedeniyle azollere dirençli *C. albicans* olgularıda klinikte önemli bir sorun haline gelmiştir (Neves, 2008).

Vulvovajinal candidozte amaç 48–72 saat içinde semptomların tamamen ortadan kaldırılması, 4–7 gün içerisinde de mikolojik kür sağlanmasıdır. Tedavide ilk tercih oral azol preparatlarıdır (imidazoller veya triazoller). Azoller ile tedavide kür

sağlanamadığında lokal tedaviye geçilir. Borik asit lokal tedavi alternatifleri arasındadır. Oral terapinin lokal tedaviye üstünlüğü olmadığı buna ek olarak lokal tedavinin pek çok avantajı olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Vajinaya lokal olarak uygulanan antifungal ilaçlar, gereksiz ilaç absorsiyonuna neden olmaz, dolayısıyla yüksek kan konsantrasyonu düzeylerini önler. İlaç etkileşimlerinin bu sayede önüne geçilir. Hamilelik ve emzirme sırasında oral tedavi rejimlerinden kaçınılır. Ayrıca lokal tedavi çok daha ucuz bir tedavi yöntemidir. Örneğin tek doz flukanazol (150 mg) ile tedavi maliyeti 26USD iken 14 günlük lokal borik asit terapisinin maliyeti 5USD'dır (Neves, 2008). İlaç direnci olan veya sık relaps görülen kronik vajinal candidozli olgularda yüksek tedavi başarısını gösteren pek çok çalışma vardır (Ray, 2007). Bu klinik gözlemden yola çıkarak araştırmacılar borik asitin pek çok yeni analogunu elde etmek için çalışmaktadırlar. Farklı organizmalara etki eden borik asit analogları bulunmuştur (Waasbergen, 2007; Jabbour, 2005; Baker, 2006).

Bortezomib (Velcade), FDA (Food and Drug Administration) onayı almış ve parenteral kullanılabilen tek borik asit analogudur. Bir proteosome inhibitörüdür ve multiple myelom tedavisinde kullanılmaktadır. Sıtma paraziti üzerinde antiparaziter etkinliği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda kullanacak olduğumuz, ZL3B, bu preparatın, ticari olarak elde edilebilen tek formudur (Reynoulds, 2007).

Boronik asitler, açıl gruplarının transferinde rol alan enzimleri, özellikle de hidrolazları; kimotripsin, tripsin, trombin ve diğer proteazları inhibe ederler. Bu etkiyi, proteazların aktif bölgesine, özellikle de serin rezidülerine bağlanarak gösterirler. Proteosome, hücrelerdeki major non-lizozomal endoproteazdır. Hücre içinde yanlış yapılandırılmış ve ubiquitinle işaretlenmiş proteinlerin yıkılmalarını sağlar. Regülâtör proteinlerin ubiquitin aracılı yıkımı, hücre siklus progresyonu, sinyal ileti, transkripsiyonel düzenleme ve apoptozis gibi metabolik olayların kontrolünde önemli rol oynar. *Candida* türlerinde de ubiquitin aracılı yolların varlığını göstermeyi amaçlayan çalışmalar yapılmaktadır (Myung, 2001).

Çalışmamızda, bir borik asit analogu ve aynı zamanda bir proteosome inhibitörü olan; ZL3B etken maddesinin, *Candida* kökenleri üzerindeki antifungal etkinliği ve bu etkiyi hangi mekanizma ile gerçekleştirdiğinin in-vitro olarak saptanması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Candida'lara ait bilgiler Hipokrates'e kadar uzanır.

1665'de ilk defa Galen pamukçuğu tanımlamıştır. 1839'da Langanbek oral lezyonlu bir hastadan maya izole etmiş, 1841'de Berg aftöz membran materyali ile bebekleri aşilayarak pamukçuğun etiyolojisini tespit etmiştir. 1843'de Robin bu organizmayı *Oidum albicans* türü ile ilişkilendirmiştir. Wilkonson 1849'da vajinal kandidozu bulmuş, Hausmann da 1875'de vajinal *Candida* enfeksiyonu ile bebeklerde görülen pamukçuğun ilişkisini ortaya koymuştur. 1940'larda antibiyotiklerin klinik kullanıma girmeleri ile daha önceden rastlanmayan *Candida* enfeksiyonlarının çeşitli klinik formları görülmeye başlamıştır (Pirinçiler,1995).

Bu enfeksiyonun önlenmesinde özel bir organizasyonun gerekli olduğu 1950'li yıllarda anlaşılmış ve ilk kez organize komiteler 1970'li yıllarda Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde ve İngiltere'de kurulmaya başlamıştır. 1970'de CDC (Centers for Disease Control and Prevention) ABD'deki ulusal hastane enfeksiyon verilerini prospektif olarak toplamak ve analiz etmek amacıyla NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance) sistemini kurdurmuş ve böylece ülke bazında hastane enfeksiyon oranlarını, faktörlerini, enfeksiyon bölgelerini belirlemek mümkün olmuştur. Bugün ABD'de yaklaşık 150-200 hastane NNIS kapsamında olup bu konu ile ilgili en organize verileri dünyaya gönderen sistemdir (Ener, 1999).

2.2. Mantarların Genel Özellikleri

Mantarlar ökaryotik canlılardır. Diğer ökaryotlardan hücre duvarlarının olmasıyla ayırılırlar. Morfolojik yapılarına göre küf ve maya olmak üzere iki grupta incelenirler. Bazı mantarlar, doğal ortamlarda küf, insan vücut sıcaklığında (37°C) maya şeklindedirler. Bunlara dimorfik mantarlar denir. Eşeyli veya eşeysiz

üreyebilirler. Mayalar tek hücreli mantarlardır. Tomurcuklanarak (blast formasyonu) veya ikiye bölünerek çoğalırlar. Çapları 2-20 µm, boyları 2-50 µm arasında değişir. Bir maya hücresinden tomurcuklanarak oluşan yavru hücreye blastokonidyum denir. Bazı mayalarda oluşan blastokonidyumlar ana hücreden ayrılmadan ardı ardına uzar. Ana hücreden peşi sıra oluşan yavru hücrelerin oluşturduğu uzantıya yalancı hif (psödohif) denir (Murray, 2007).

Mantarlar üreme biçimleri, yapıları, yaşam döngüleri ve bazı fizyolojik özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Eşeyli üremesi saptanmayan mantarların tümü, *Deuteromycetes (Fungi imperfecti)* sınıfında incelenirken, eşeyli üremeleri saptanan mantarlar *Zygomycetes*, *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes* sınıflarında incelenirler (Murray, 2007).

Mantarların üremeleri için organik bir azot ve karbon kaynağına gereksinimleri vardır. Bir çok mantar glukozu kolaylıkla parçalayabilir. Bu nedenle mantarların üretilmesinde kullanılan primer besiyerlerinde hep glukoz vardır. Mantarlar aerop mikroorganizmalar olduğu için, klinik örneklerin taşınması ve kültürü, aerop koşullarda yapılmalıdır. Pek çok mantarın optimal üreme pH'sı, 6.8-7 ve optimal üreme sıcaklığı, 25-35°C'dir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında mantarlar için zenginleştirilmiş (beyin-kalp infüzyon agarı, malt ekstreli besiyeri), seçici (Sabouraud besiyeri) ve ayırıcı (üre agarı) besiyerleri kullanılır (Murray, 2007).

Tıbbi önemi olan mantarların ana gruplarını gösteren şema tablo 2.1'de gösterilmiştir. Buna göre *Candida* türleri eşeysiz üreme özelliği gösteren *Deuteromycetes* sınıfında yer almaktadır (Murray, 2007).

Tablo 2.1. Mantarların Sınıflandırılması

	Eşeysiz	Eşeyli Üreme	Örnek
<i>Zygomycetes</i>	Sporanjiospor oluşumu	Zigospor	<i>Rhizopus, mucor, absidia</i>
<i>Ascomycetes</i>	Konidya oluşumu	Askospor	<i>Saccharomyces, Trichophyton, Histoplazma, bazı Aspergillus türleri</i>
<i>Archiascomycetes</i>	“Binary Fission” (ikiye bölünme)	Eşeyli üremenin sonucunda, içinde sporlar bulunan kistler oluşur.	<i>Pneumocystis jiroveci</i>
<i>Basidiomycetes</i>	Bilinmiyor	Bazidyospor	Cryptococcus
<i>Deuteromycetes</i>	Konidya oluşumu	Tanımlanmamış	<i>Candida, Aspergillus</i>

2.3. *Candida* Kökenlerinin Morfolojisi

Candida kökenleri 6 µm büyüklüğünde, oval veya yuvarlağımsı, tomurcuklanan hücreler olarak görülürler. Yalancı hif (psödohif) oluştururlar. Bunlar arasında *C.albicans*, blastokonidyum ve yalancı hif yanında gerçek hifler de oluşturarak dimorfik özellik gösterir (Murray, 2007).

Candida kökenleri Sabouraud-dekstroz-agar (SDA) gibi bir besiyerinde, oda sıcaklığında ve 37°C’de 24 saatte üreyip genellikle kirli-beyaz veya krem rengi, yumuşak kıvamlı ve tipik olarak mayamsı kokulu koloniler yaparlar. Koloninin besiyeri yüzeyinde kalan bölümü blastokonidyumlardan oluşur; besiyeri yüzeyinin altında ise yalancı hifler bulunur. Tween 80 agarda, 25°C’de ve 72 saatte, psödohif, septalarında yuvarlak blastokonidyalar ve geniş, kalın- duvarlı terminal klamidosporeler oluşturur (Murray, 2007).

Candida kökenleri, mısırunlu agarda saptanan blastokonidyumların özellikleri ve blastokonidyumların yalancı hif boyunca dizilimlerine göre isimlendirilirler. Türlerin kesin tanısı, daha sonra yapılan şeker fermentasyonu ve biyokimyasal deneyler ile konur. Tablo 2.2.’de bazı önemli *Candida* türlerinin önemli kimyasal özellikleri

verilmiştir (Murray, 2007).

Tablo 2.2. Bazı Önemli *Candida* Türlerinin Önemli Kimyasal (Asimilasyon) Özellikleri

	glukoz	maltoz	sukroz	trehaloz	galaktoz	sellobiyoz	ksiloz	rafinoz	laktoz	dulsiitol	melibiyoz	üreaz	NO ₃ NO ₂
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. kefyr</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C. albicans iki morfolojik test ile diğer kökenlerden ayrılır. Serum içinde 37°C’de iki saat inkübe edildiğinde *C. albicans* türleri gerçek hif oluşturur. Ana hücreden boğum oluşturmadan bir borucuk uzar ve “germ-tüp” adı verilen yapıyı oluşturur (Murray, 2007).

C. tropicalis gerçek hif oluşturabilir, nadiren klamidospor yapar, sukrozu asimile eder ve bu özelliği ile, kendisine çok benzeyen ancak sukrozu asimile etmeyen *C. paratropicalis*’ten ayrılır (Murray, 2007).

C. glabrata’nın, en önemli karakteristik özelliği mısır unlu agarda hifa veya psödohifa oluşturmamasıdır (Murray, 2007).

C. parapsilosis eğri ve kısa psödohif, nadiren dev hücreler ve geniş hifal elemanlara sahiptir (Murray, 2007).

C. lusitaniae morfolojik olarak *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*’e benzer, sellobiyozu fermente etme ve ramnozu asimile etme özelliği ile bunlardan ayrılır (Murray, 2007).

C. krusei sikloheksimide duyarlıdır, dekstrozu fermente eder, galaktozu asimile etmez (Murray, 2007).

C. guilliermondii kolonileri bekledikçe pembeleşir ve kısa psödohiflere sahiptir (Murray, 2007).

2.4. Antijenik Yapı

C. albicans, hücre duvarında bulunan ve potent immünojen olan mannanın yapısal farklılıklarına göre A ve B olmak üzere iki serotipe ayrılır. *C. albicans*'ta mannan dışında başka antijenler de saptanmıştır; salgısal proteazlar, enolaz ve ısı şok proteinleri en önemlileridir. Yaşam boyu *Candida* ile temastan ötürü, bireylerin çoğunluğunda, mantara karşı, hem serumda özgül antikolar, hem de hücrel bağışıklık vardır (Morrison, 2003).

2.5. *Candida* Kökenlerinin Virülans Faktörleri

Patojen bir mayanın vücutta enfeksiyon oluşturabilmesi için, patojen organizmaların, konak hücre membranının yapısında bulunan lipid ve protein yapısındaki molekülleri substrat olarak kullanan fosfolipaz ve esteraz gibi hidrolitik enzimler salgılaması ve bu enzimlerin aktivitesi sonucunda invazyon oluşması gerekir. Bu faktörlerin dışında hücre duvarında mannan, slime üretim yeteneği ve hidrofobisite gibi diğer özellikler *candidaların* aderensini ve kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır. Patojen mantarların oluşturduğu derin enfeksiyonlar incelendiğinde, epidermis ve mukozaların üst tabakalarında kolonizasyonla başlayarak daha derinlere doğru ilerlediği görülmüştür (Yücel, 2000; Yücel, 2001; Dolapçı, 2002).

2.5.1. Adezyon

Candidaların mukozal epitel hücrelerine veya endotel hücrelerine bağlanması kolonizasyonun ilk aşamasıdır ve kandidozun ortaya çıkmasında önemli bir adımdır. Adezyon karmaşık bir işlem olup birden fazla adezinin ve birden fazla bağlanma mekanizmasının etkisi ile gerçekleşir. *Candida* adezinleri lektin benzeri hücre yüzey proteinleri ve konak epitel hücre glikoproteinlerini tanıırken *candidaların* yüzey proteinleri ise epitel ve endotel hücrelerindeki protein veya

peptid bağlarını tanırlar. Protein-protein ilişkisinde fibronektin, fibrinojen, kompleman reseptörleri, integrin benzeri moleküller rol oynamaktadırlar. Fibrinojene bağlanan yüzey proteinleri maya hücrelerinde gösterilmiştir. Bağlanma oranının hiflerde mayalardan 12 kat, germ tüpünde ise 7-8 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Kompleman C3 dönüşüm ürünleri olan C3d ve iC3b reseptörleri ile bağlanan proteinler hem maya hem hiflerde gösterilmiştir (Çerikçioğlu, 2008).

2.5.2. Dimorfizm

Dimorfizm, maya – germ tüp (hif) dönüşümünü belirleyen bir süreç olup, önemli bir virulans faktörüdür (Çerikçioğlu, 2008; Yücel, 2000). Dimorfizmin ısı, pH ve besinlerle düzenlendiği bildirilmektedir. Optimum şartlar olan 33 - 42°C ve pH 6-8 aralığında germ tüpü oluşmaktadır (Çerikçioğlu, 2008).

2.5.3. Yüzey hidrofobisitesi

Candida kökenleri ile yapılan araştırmalarda hücre yüzey hidrofobisitesi, organizmaların adezyonunda rol alan önemli bir mekanizma olarak belirlenmiştir (Hazen, 2003; Masuoka, 2004).

C. albicans ile yapılan araştırmalarda yüzey hidrofobisitesinin hücre duvar yapısıyla doğrudan ilişkili olduğu belirtilmektedir. *C. albicans*'ın hücre duvarında meydana gelen farklılaşmalar hücre yüzey hidrofobluğunda değişikliğe neden olmaktadır. Hidrofobisitenin, mayanın üreme safhası ve üreme koşullarına bağlı olarak da değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (Masuoka, 2004).

C. albicans kökenlerinde hidrofobisitedeki artış ile kökenlerin patojenitesi arasında paralellik saptanmıştır. Hidrofobik maya hücrelerinin, hidrofilik hücreler ile kıyaslandığında ekstrasellüler matriks proteinlerine, endotel ve epitel hücrelerine, musin gibi konak substratlarına daha kuvvetle tutundukları ve de nötrofiller tarafından fagositoza karşı daha dirençli oldukları görülmüştür (Hazen, 2003; Masuoka, 2004).

2.5.4. Hücre duvarı

*Candidalar*ın virülansında hücre duvar komponentlerinden olan mannoprotein önemli rol oynamakta ve antijen olarak konağa sunulmaktadır. Mannan hücrel ve humoral yanıtı arttırmakta veya baskılamakta ve enfeksiyonun sürekliliğine neden olmaktadır (Çerikçioğlu, 2008).

2.5.5. Fenotipik değişim

*Candidalar*ın fenotiplerinde in vivo ve in vitro ortamda değişim olduğu gösterilmiştir. Bu özellik etkenin, ortama uyum sağlamasını kolaylaştırmakta, oluşan antijenik değişim sayesinde etken immün sistemden kaçabilmekte ve antifungallere karşı duyarlılıkta değişiklik meydana gelebilmektedir (Hazen, 2004).

Fenotipik değişim, *candida* kökenlerinde spontan olarak sıklıkla gözlenen geri dönüşümlü bir olaydır ve görülme sıklığı 10^2 - 10^4 tür. Fenotipik değişimin sonucunda; düzgün (smooth), tüylü (fuzzy), düzensiz (irregular), yıldız (star), halka (ring), noktalı (stippled) ve şapka (hat) olmak üzere yedi farklı fenotip oluşmaktadır. Bunun dışında bazı kökenlerde fenotipik değişim sonucu varyant koloni morfolojileri de ortaya çıkmaktadır. Beyaz fenotipten, opak fenotipe geçişe daha yüksek oranda rastlanırken; opakdan beyaza değişim oranı daha düşüktür. *Candida* kökenlerinin büyük kısmı beyaz fenotiptedir (Yang, 2003).

Fenotipik değişim, klinik açıdan önem taşır çünkü bu değişim antifungal ilaçlara duyarlılığı, konak hücreye adezyonu, antijenik yapıyı, aspartik proteinaz aktivitesinin düzeyini, nötrofil ve oksidanlara duyarlılığı ve hayvan deneyleri verilerine göre virülansını etkileyebilmektedir (Yang, 2003).

2.5.6. Toksinler

C. albicans'da endotoksine benzer bir toksin bulunduğu gösterilmiş ve bu toksinler yüksek molekül ağırlıklı ve düşük molekül ağırlıklı olmak üzere iki grupta toplanmıştır. Yüksek molekül ağırlıklı toksinler, glikoprotein toksinler ve kanditoksinlerdir. Glikoprotein toksinler, sağlam hücrelerin duvar yapılarında bulunur. Glikoprotein molekülünün hem protein hem de şekerlerinin toksik etki için gerekli olduğu, bu etkide başlıca rolü mannanın oynadığı ve proteininde yardımcı olduğu öne sürülmüştür. Kanditoksin de *C.albicans* kökenlerinden izole edilmiştir. Farelere intravenöz uygulandığında öldürücüdür. Sitotoksik etkisi, farmakolojik ve immünolojik özellikleriyle enfeksiyonu arttırıcı yeteneği de gösterilmiştir (Ghamnnoom, 1990).

2.5.7. Enzimler

2.5.7.1. Hemolizin enzimi

*Candidalar*ın sahip olduğu hemolizin enzimi eritrositleri parçalayarak hemoglobinin denatüre olmasına neden olur, hemin yapısı bozulur ve demir açığa çıkar. *Candidalar* bu Fe'i kendi metabolik faaliyetlerinde kullanırlar (Luo, 2001).

Hif formlarının hemolitik aktivitesi, maya formlarının hemolitik aktivitesinden 2-3 kat fazladır. Dissemine kandidoza neden olan *C.albicans* kökenlerinin tamamına yakınının yüksek hemolitik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Luo, 2001).

2.5.7.2. Salgısal asit proteinaz (SAP) enzimi

Patojen mantarlar konağın hücre zarlarında işlev bozukluğuna sebep olan ve dokuda ilerlemelerine yardımcı olan hidrolitik enzimler salgırlar. Bu enzimlerden biri olan asit proteinazlar peptid bağlarını hidrolize eden önemli bir hidrolitik enzim ailesidir (Yücel, 2000; Mardegan, 2006).

Asit proteinaz çok geniş bir substrat özgüllüğüne sahiptir, substratları arasında albumin, C3 protein, laktoperoksidaz, α -2 makroglobülin, fibronektin, kollajen, hemoglobin, kazein, Ig A, tırnak ve deri kökenli epidermal keratin gibi azot kaynağı olan proteinler bulunur (Calderone, 2001).

Candida kökenleri tarafından salgılanan asit proteinaz, IgA₁ ve IgA₂ antikorlarının ağır zincirlerini parçalamaktadır. Böylece IgA'nın immünolojik bariyer oluşturduğu mukoz membranlar ve gastrointestinal kanalda mikroorganizmanın kolonizasyonunu kolaylaştırarak enfeksiyonun yayılmasına zemin hazırlamaktadır. Ayrıca salgısal asit proteinaz derideki keratini parçalayarak kolonizasyonda ve epitel doku invazyonunda önemli rol oynamaktadır (Calderone, 2001).

Moleküler çalışmalar doğrultusunda *C. albicans*'ta SAP'ın üretiminden sorumlu bir çok farklı SAP geninin (SAP1-SAP10) mevcut olduğu bulunmuştur. Bu genlerin ürünü olan SAP izoenzimlerinin, in-vivo ortamda farklı fonksiyonlar gösterdiği ve de enfeksiyonun farklı safhalarında rol aldıkları bildirilmiştir (Calderone, 2001; Yang, 2003; Mardegan, 2006; Haynes, 2001). SAP gen ailesinin sadece en patojen *Candida* kökenleri'ne özgü olduğu belirtilmiş ve *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*'de de bu genin varlığı gösterilmiştir. Klinik olarak daha az izole edilen *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*'nin proteolitik olmaması ve de patojen olmayan *Saccharomyces cerevisiae*'da SAP geninin bulunmaması SAP'ın virulansla ilişkili olduğunu destekler niteliktedir (Mardegan, 2006).

SAP gen ekspresyonu organizmanın maya fazından hif fazına geçişi ve fenotipik değişimi ile ilişkilidir. SAP1, SAP2, SAP3 genleri sadece maya hücrelerinde, SAP4, SAP5, SAP6 ise hif hücrelerinde eksprese olur (Naglik, 2003).

Klinik ve deneysel bulgular proteinazın *candidaya* bağlı vajinit patogenezinde önemli bir virulans faktörü olduğunu desteklemektedir. Vajina ortamı aspartik proteinazın indüksiyonu ve ekspresyonu için çok uygundur. Enzim izoformlarının nötral pH'da da aktif olması, salgılanması için mutlak asidik ortam gerektiği fikrini çürütmüştür. Enzim vajinada özgül antikorlar tarafından inhibe edilememektedir (Bernardis, 1989).

2.5.7.3. Fosfolipaz enzimi

İlk kez 1960 yılında, *candidaların* fosfolipaz salgıladığı, yumurta sarısı içeren katı besiyeri kullanılarak ortaya konmuştur (Ghannoum, 2000; Yücesoy, 1999).

Fosfolipazlar birçok patojen mikroorganizma tarafından salgılanan, hücre membranındaki gliserofosfolipitlerde bulunan ester bağlarından birini ya da daha fazlasını hidrolize eden heterojen bir enzim grubudur (Yang, 2003).

Fosfolipaz A enzim etkinliği tomurcuk oluşturma ile ilişkilidir. Hiflerin yaşlı kısımlarında fosfolipaz etkinliği hücre içine yönelip, otolize neden olabilir (Monod, 2002).

Hücre dışı fosfolipaz enziminin *C. albicans*'ın virulans ve patogeneğinde önemli bir rolesahip olduğu belirtilmektedir. Ekstrasellüler fosfolipazlar fosfolipitleri parçalayarak, konak hücre membranında hasara yol açabilmektedir (Ghannoum, 2000).

2.5.7.4. Esteraz enzimi

Bazı *Candida* kökenleri'nin, fosfolipazın yanı sıra esteraz gibi enzimleri salgılayarak, lipolitik aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Stehr, 2000).

İlk kez 1978 yılında Walter Rudek (Rudek, 1978) adlı araştırmacı *Candida* kökenlerinde esteraz aktivitesini, tween 80 içeren katı besiyerinde (pH 5.5) opasite testi ile göstermiştir. Esteraz enziminin substratları arasında yer alan ve insan derisinin stratum korneum tabakasında yüksek oranda bulunan triaçilgliserol ve monoaçilgliserol substratları, lipolitik enzimlerin aktivitesi sonucunda parçalanmakta ve bunun neticesinde mikroorganizmanın invazyonu ve kolonizasyonu kolaylaşmaktadır. Bu enzimin aynı zamanda üreme sürecinde de rol aldığı gösterilmiştir (Tsuboi, 1996).

2.5.8. Biyofilm oluşumu

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanır (Türetgen, 2006).

Biyofilm tabakası; hücreleri bir arada tutup, difüzyon kalkanı ya da moleküler filtre gibi davranarak, barındırdığı mikroorganizmaları; başta klor olmak üzere dezenfektanlardan, besinsizlikten, kuraklıktan, pH dalgalanmalarından, toksinlerden ve virüslerin zararlı etkilerinden korur (Türetgen, 2006).

Biyofilm, fırçalanmayan dişlerin dış yüzeyi, su kanal borularının iç yüzeyi, kateter, eklem ve kalp protezleri gibi kalıcı olmayan yabancı cisim enfeksiyonlarında karşımıza çıkar (Pascual, 2002).

Biyofilm tabakasından söz edilmesi için gereken 3 temel eleman yüzey, mikroorganizma ve EPS'dir. EPS, terminolojide "exopolysaccharides", "slime" ya da "exopolymers" terimlerinin karşılığı olarak kullanılmaktadır. EPS biyofilm tabakasından bakterilerin hücre dışına saldıkları ve onları bir arada tutan çimento gibi düşünülebilir (Türetgen, 2006).

Mikroorganizmalar, hidrofobik ortamlarda serbest yüzmek yerine bir yüzeye tutunmayı tercih ederler. Bunun sebepleri; tutunduğu yüzeyde besin kaynağı olması, suyun akışıyla tutunduğu yere besin maddesi taşınması ya da su akışı sayesinde bol oksijen bulunması olabilir. Biyofilm tabakasının oluşumundaki ilk basamak yaklaşımdır. Mikroorganizma, tutunacağı yüzeye aktif hareket ya da konveksiyon ile yaklaşır. Yüzeye kritik uzaklıkta olduğu anda [yaklaşık 1 nanometre], mikroorganizma itici ve çekici güçlerin etkisiyle ya yüzeye yapışır ya da itilir. Tutunma ya da adezyon mekanizması hakkındaki farklı teoriler çeşitli bilimsel disiplinlere göre açıklanmakla birlikte, adezyon oluşumu iki aşamalı genel bir işleme göre gerçekleşmektedir. İlk etapta yüzey üzerine mikroorganizmaları, bir anlık çeken ve tutan geri dönüşebilir bir faz oluşumu, ikinci etapta ise yüzey üzerinde mikroorganizmaların geri dönüşümsüz, sağlam ve katı bir birikimine neden olan bir matriksin gelişimi. Bu itici ve çekici güçler; elektrostatik ve hidrofobik

etkileşimler, van der Waals bağlarının kuvveti, sıcaklık, hidrodinamik güçler olarak tanımlanmaktadır. Elektrostatik etkileşimler daha çok itici güçlerdir, çünkü mikroorganizmalar ve katı yüzeyler negatif yüklüdür. Yüzeyle ilk temasın gerçekleşmesinde hidrofobik etkileşimlerin katkısı büyüktür. Bunun yanında mikroorganizmaların tutunmasını kolaylaştıran hücre dışı yapılar, pH, besin miktarı, sıcaklık da yüzeyle yapışmada etkili role sahiptir. Mikroorganizma, sahip olduğu hücre dışı uzantılar ya da saldırdığı polimerler ile yüzeyle sıkıca bağlanır. Bu bağlanma geri dönüşümsüzdür. Yüzeyle sıkıca tutunan mikroorganizma burada çoğalarak önce mikrokolonileri, mikrokolonilerde büyüyerek ve genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur (Türetgen, 2006).

Özetle; biyofilm oluşumunda önce fizikokimyasal, daha sonra biyolojik 4 aşama için içine girmektedir (Türetgen, 2006).

- 1- Organik moleküllerin kimyasal adsorpsiyonundan ileri gelen yüzey değişimi (kan ile karşılaşan yüzeylerde fibrin birikmesi gibi)
- 2- Yüzeyle yavaş yavaş kolonileşme (adezyon)
- 3- Çok tabakalı yapıya ulaşan bakteriler tarafından çeşitli organik maddelerin (ESP, olymères extracellulaires-Slime) sentezi
- 4- Olgunlaşmış biyofilmin gelişmesi (kolonizasyon)

Candida kökenlerinin yabancı cisimlere slime faktörü aracılığı ile tutunması, hem sürekli bir enfeksiyon odağı gibi rol oynamalarına hem de vücudun savunma mekanizmalarından ve antifungal tedavinin etkilerinden kurtulabilmelerine yardımcı olan bir özelliktir (CDC, 2011).

Yabancı cisimler ile ilişkili enfeksiyonların çoğunda Gram pozitif bakteriler, sıklıkla stafilokoklar, etken olduğu halde gram negatif bakteriler ve mantarlar ile oluşan enfeksiyonlar daha ciddi seyirlidir. Fungal enfeksiyonlar çoğunlukla patojenik *Candida* kökenleri, özellikle *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* ile olmaktadır (CDC, 2011).

Candida biyofilminin antifungal direnç gelişiminde katkısı olduğu düşünülmektedir. Biyofilm içerisindeki ekstraselüler matris miktarı, yavaş üreme hızı, besin kısıtlaması, membran lokalize eflüks pompalarının fazla ekspresyonu (MDR1, CDR1 ve CDR2 genleri) ve biyofilmdeki sterol miktarının bu direnç gelişimine katkısı olduğu düşünülmektedir. *Candida* biyofilminin saptandığı ve enfeksiyonlara yol açabildiği başlıca yabancı cisimler: santral venöz kateterler, üriner kateterler, eklem protezleri, arteriyovenöz fistül veya greftler, periton diyalizi kateterleri, yapay kalp kapakçıkları, pacemaker, ventriküloperitoneal şantlardır (CDC, 2011).

2.6. Fungal Patogenez

Patojen bir organizmanın vücuda girmesi enfeksiyonun oluşumunda ilk aşamadır ancak enfeksiyonun meydana gelmesi için yeterli değildir. Patojen mantarlar konak bağışıklığını yenmek ve üreyebilmek için fosfolipaz, proteinaz, esteraz gibi hidrolitik enzimlere ve aderensi kolaylaştıran hidrofobisite ile slime üretimi gibi bazı virulans özelliklerine sahip olmalıdır (Ghannoum, 1990).

Konak hücre membranının yapısında bulunan lipid ve protein yapısındaki moleküller, patojen organizmaların, bu bileşikleri substrat olarak kullanan fosfolipaz ve esteraz gibi hidrolitik enzimler salgılamasına neden olmakta ve bu enzimlerin aktivitesi sonucunda invazyon oluşmaktadır. Bu faktörlerin dışında çeşitli yüzeylere tutunma, slime üretim yeteneği ve hidrofobisite gibi diğer özellikler *candidaların* aderensini ve kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır. İnsanlarda sıradan bir kommensal olarak bulunan *Candida* konağın savunması zedelendiğinde dokulara yayılarak hastalık oluşturur (Paul, 2002).

Mantarın kökenine bağlı olan bir kısım faktörler konağın bağışıklığını yenmek için birlikte rol oynarlar. Patojenlik özellikleri denilen bu faktörler *C.albicans* ve diğer *Candida* kökenlerinin virulansını belirler. Bugünkü yaklaşım, artan ilaç kullanımı, cerrahi girişimler, organ nakilleri ve AIDS gibi bireyin bağışıklık sistemini zayıflatan çeşitli sebeplerle tüm *Candida* kökenlerinin potansiyel patojen olabileceği yönündedir. Birkaç mantar tam anlamıyla patojen olduğu halde büyük

bir kısmı kommensaldir. Mantar enfeksiyonlarının oluşması konağın bağışıklık durumuna, enfeksiyonun tipine, şiddetine ve etkenin virulans faktörlerine bağlıdır (Çerikçioğlu, 2002).

2.6.1. Etken-konak ilişkisi

C. albicans normal immün cevabı olan bireylerde ender, zayıflamış immün cevabı olan kişilerde ise daha sık konak hasarına yol açar. Konak hasarını *candidaların* virulans faktörleri ve mantara karşı savunma mekanizmaları aracılığı ile verilen konak immün cevabı belirler. Genel olarak *candida* enfeksiyonlarının patogenezinde konağın rolünü belirleyen, savunma mekanizmalarında yer alan hücreler, faktörler, yapılar ve bunların işlevlerindeki defektlerdir (Çerikçioğlu, 2002).

2.6.2. Bağışıklık

Sağlıklı bireylerde *candida* enfeksiyonlarına karşı güçlü bir doğal direnç bulunur. Mikroorganizma kommensal olarak vücutta yaşar ve konağın bağışıklık sisteminde bir değişim ya da predispozan faktörler olmadıkça genellikle hastalık oluşturmaz. Sağlıklı bireylerde hastalık oluşturmaksızın bulunmasının yanında *candidaların* oluşturduğu enfeksiyonların çeşitliliği ve çok farklı organ veya dokuyu tutabilmesi, bu organizmaya karşı konakta meydana gelen bağışık yanıtın değişimiyle ilişkilidir. Mantar hücre duvarının kompleks polisakkarid yapısına sahip olması, polimorfizm gösteren *candidaların* değişik ortamlarda hif veya maya şeklinde bulunması; antijenik uyarının düzensiz olmasına, ve heterojen bir bağışık yanıtın ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Hazen, 2003).

Antifungal tedaviye yanıtta rol oynayan immün sistem hücreleri; fagositozdan sorumlu olan monosit, makrofaj, dendritik hücreler ve nötrofillerdir. Kandidoz gelişmesinde ve enfeksiyonun ilerlemesinde en önemli risk faktörleri nötrojeni ve polimorf nüveli lökosit (PMNL) disfonksiyonu olarak bildirilmektedir.

Yapılan çalışmalarda *C.albicans*'a karşı efektif fagositoz ve öldürme mekanizmasında nötrofillerdeki CD64, CD89'un önemli rol oynadığı ortaya konmuştur. Mantara ait antijenlerin ortaya çıkması sonucu indüklenen IL-2 ve IFN- γ , TNF- α , G-CSF ve GM-CSF ile fagositlerin antifungal aktiviteleri artmaktadır (Nomanbhoy, 2002).

Nötrofillerdeki niteliksel ve niceliksel defektler invazif hastalık için predispozan faktördür. Nötrofiller mantarın blastospor ve hif yapılarına karşı önemli savunma hücreleridir. Genel olarak nötrofillerin öldürücü etkisi daha önceden sitokinler tarafından aktive edilirse artmaktadır. Nötrofiller tarafından *C.albicans* blastosporlarının fagositozu ve öldürülmesi germ tüpü ve uzun hiflere göre daha kolaydır. Mantarın optimal olarak hücre içinde öldürülmesi için opsonin gerekli iken, nötrofillerin *C.albicans* blastosporunu fagosite etmesi opsonin yokluğunda olur. Ancak nötrofillerin *C.albicans*'ı öldürme yetisi hücre içine alınmış yapıların germ tüpü oluşturması, fagolizozomların içeriğinin salınımındaki defektler, mantar yapılarının nötrofil degranülasyonunu inhibe ettiği durumlarda sınırlanabilir. Nötrofiller aynı zamanda endotel üzerinde tomurcuklanan *candidaların* temizlenmesinde de çok etkin rol oynarlar (Hazen, 2003; Nomanbhoy, 2002).

Mononükleer fagosit hücreleri tarafından mantarın bağlanması ve hücre içine alınması CR1, CR4, FcR ve CD14 reseptörleri aracılığı ile gerçekleşir. Makrofajlar mantarların dokulara yayılmasını önleyen bir ortam oluştururlar. *Candida* blastosporlarının makrofajlarla ilişkisini ve fagositozunu CR3, fibronektin gibi bazı faktörler etkiler. Makrofajların *C.albicans*'ı fagosite etmesi ve öldürmesi mannoz reseptörleri ile orantılıdır. En yüksek öldürme aktivitesi opsonize edilen mayalara karşı gözlenmiştir (Hazen, 2003; Naglik, 2003).

Makrofajların anti-*candidal* aktivitesi mantarın yapısı yani maya ya da hif formunda oluşu ve bulunduğu anatomik yerleşim alanı ile de ilgilidir. *Candida*'lar hem maya hem hif formunda enfekte dokuların hücre içi ve hücre dışı alanlarında bulunurlar (Naglik, 2003).

2.7. Vulvovajinal Kandidoz (VVK)

Candida kökenleri asemptomatik, sağlıklı ve doğurganlık çağındaki kadınların genital sisteminden %20 oranında izole edilebilir (Usluer, 2008). Vajen mukozası pek çok endojen flora elemanı ile kolonize durumdadır. Vajinal enfeksiyon etkeninin bu flora elemanlarından ayrılması gerekmektedir. Kadınlarda genital bölgede bulunabilecek olan mikroorganizmalar: Laktobasiller, (primer olarak *Lactobacillus crispotus* ve *Lactobacillus jensanii*), *Corynebacterium türleri*, *Gardnerella vaginalis*, koagülaz negatif stafilokoklar, *S.aureus*, *S. agalactiae*, enterokok türleri, *E. coli*, anaerob bakteriler ve mayalardır. Vajinal flora değişken, dinamik bir eko sistemdir ve normal şartlarda birçok bakteri vajinal sekresyondan üretilir. Puberte öncesi kadınlarda difteroid çomaklar ve koagülaz negatif stafilokoklar çoğunlukta iken, doğurganlık döneminde laktobasiller baskındır. Menopoz dönemindeki kadınlarda az miktarda laktobasil bulunmakla birlikte *Enterobacteriaceae türleri* daha fazladır (York, 2004). Vajina epitelini çok katlı, yassı epitel olup, normalde çok az keratinizasyon gösterir, glikojen yönünden zengindir. Östrojenik uyarı ile epitel hücrelerinde bol miktarda glikojen sentezlenir ve depolanır. Vajina lumenine dökülen epitel hücrelerindeki glikojen vajinada bulunan flora bakterileri tarafından metabolize edilerek asit oluşur ve sonuçta vajina pH'sı 3.8 – 4.4 arasında asidik seviyede tutulur. Vajina epitelini hormonal etki altında değişiklik gösterir (Bochmann, 2000).

Yenidoğan vajinasında birkaç hafta süre ile aerobik laktobasiller mevcut olup, pH'sı asit özelliktedir. Daha sonraki puberte dönemine kadar vajina epitelini ince ve glikojen yönünden fakir olduğu için pH nötrdür. Puberteden sonra vajina hormonal etki ile kalınlaşır, glikojen yönünden zenginleşir ve östrojenin etkisi ile vajinanın yüzeysel hücrelerinde keratinizasyon gelişir, floraya çok sayıda bakterinin eklenmesi ile pH asitleşir (Bochmann, 2000).

Normal vajinal sekresyonun kompleks bir yapısı vardır. Bu sekresyon servikal mukus ve üst genital organların sekresyonları, sebace bezler, ter bezleri, Bartholin bezi ve Skene bezleri gibi bezlerin sekresyonları, vajenin duvarından dökülen yassı epitel hücreleri ve mukus bezleri içermeyen vajenden transüstasyon ile oluşan

sekresyonlardan oluşur. Vajinal sekresyonun yapısı ve miktarı; yağ, siklus dönemi, seksüel aktivite, oral kontraseptif kullanımı, gebelik, vajinal temizlik şekli, hormonal durum, kullanılan ilaçlar ve ruhsal durum ile yakın ilişki içerisinde çok değişkendir. Normal vajinal sekresyon kokusuz, berrak veya beyaz renkli, viskoz ve homojen yapıda olur, polimorfonükleer lökosit (PMNL) içermez ve speculum muayenesinde göllenme oluşturmaz. Erişkinlerde vajinal epitel hücrelerinde biriken glikojenin yıkılması sonucu oluşan laktik asit etkisiyle normal vajinal pH asidiktir; 3.8 - 4.2 arasında değişen bu düşük pH vajinal sekresyonun her mm³'ünde 10⁸- 10⁹ asidofilik laktobasil oluşmasına imkan tanır. Epiteliyal hücrelerdeki glikojen miktarı östrojen bağımlıdır. Bu nedenle prepubertal kızlarda ve postmenopozal kadınlarda nispeten daha alkali bir vajen pH'sı oluşmaktadır (Sobel, 2007).

Tüm kadınların %75'i hayatlarının bir döneminde VVK atağı geçirir. Bu hastaların %45'i ise birden fazla atak geçirir (Sobel, 2007). Hastaların büyük bir kısmı uygun tedaviyle iyileşip, bir daha bu enfeksiyona yakalanmamaktadırlar. Ancak %5 oranında bir hasta grubunda enfeksiyon kronik bir hal alır ve rekürrent vajinit atakları görülür. Bu durum tekrarlayan VVK olarak adlandırılır ve son bir yıl içerisinde en az 4 kez mikolojik olarak ispatlanmış *candidal* vajinit tablosunun görülmesi şeklinde tanımlanır. Bu hastaların tedavisi oldukça problemlidir (Moreira, 2006; Trama, 2005).

2.7.1. Etyoloji

VVK olgularının %80 -%95'inde etken olarak *C. albicans* izole edilmektedir. Diğer etkenler ise *C. glabrata* (%5- 10), *C. tropicalis* (%3-5), *C. parapsilosis* (%3-5) *C. krusei* (%1-3), *C. kefyr* ve *C. guilliermondii* şeklinde sıralanabilir. Blastospor formları asemptomatik vajinal kolonizasyondan ve bulaşmadan sorumlu formlardır (Sobel, 2007).

2.7.2. Epidemiyoloji ve patogenezi

Candida daha çok doğurganlık çağındaki kadınlardan izole edilmektedir. Sağlıklı erişkin kadınların %10-55'inde asemptomatik vajinal kolonizasyon olduğu bildirilmektedir (Sobel, 2007).

Tekrarlayan VVK orta yaşlardaki kadınlarda daha fazla görülür, hastaların eğitim düzeyleri nispeten yüksektir. Bu durumun ortaya çıkışıyla ilgili olarak birçok endojen ve ekzojen risk faktörü ileri sürülmüş ve bildirilmiştir. Bunlar arasında en çok bilinenleri gebelik, kontrol altına alınmamış diabetes mellitus, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, oral kontraseptif kullanımı, steroid ilaç kullanımı, AIDS, sıkı ve naylondan üretilmiş iç çamaşırı kullanılması, cinsel ilişki ile ilgili alışkanlıklar ve genital temizlik amacıyla kullanılan bazı preparatlar şeklinde sıralanabilir (Sobel, 2007).

Gebelik döneminde vajinal mantar taşıyıcılık oranı belirgin şekilde artar. Her ne kadar oral kontraseptiflerin tekrarlayan VVK oluşmasında etkili bir faktör olduğu bildirilse de, özellikle son yıllarda daha düşük doz östrojen içeren doğum kontrol haplarının kullanılmaya başlanmasıyla bu fikir tartışmalı bir hal almıştır. Ancak yine de oral kontraseptiflerin en azından tekrarlayan atakların etyolojisinde araştırılması uygun olur. Geniş spektrumlu antibiyotikler laktobasiller gibi koruyucu etkisi olan vajinal bakterilerin baskılanmasına yol açarak tekrarlayan VVK'a yol açabilirler. Özellikle ampicilin, tetrasiklin ve sefalosporinler bu konuda suçlanan antibiyotiklerdir (Sobel, 2007).

Lokal veya sistemik allerjik reaksiyona sebep olan bazı maddelerin prostaglandin E₂'nin üzerinden etkili bir mekanizma ile *candidal* kolonizasyonu artırdığı bildirilmektedir. Burada herhangi bir allerjik reaksiyon nedeniyle histamin deşarjı olduğu, açığa çıkan histaminin *C. albicans* ile sinerjik bir etki yaparak fazla miktarda prostaglandin E₂ salgınımına yol açtığı, bunun da yerel hücrel immün cevabı baskıladığı ve doğrudan *candidal* proliferasyonu artırarak tekrarlayan VVK enfeksiyonlarına yol açtığı gösterilmiştir (Witkin, 1989).

Tüm bu risk faktörlerine ek olarak hipotiroidizm, stres, cinsel ilişki sıklığı ve tekniği gibi faktörler de tekrarlayan VVK için risk faktörü olarak saptanmıştır. Cinsel ilişki sıklığı ve eş sayısının artması, ayrıca son 6 ay içerisinde yeni bir eşle birlikte olmak, tekrarlayan VVK'yı artırmaktadır (Sobel, 2007).

Tekrarlayan VVK patogenezinde bir diğer teori tedavinin yetersiz olması ve vajinadan *Candidalar*ın tamamen uzaklaştırılamamasıdır. Bu teoriyi destekleyen iki önemli faktör vardır. Bunlardan birincisi kültür negatif olan kadınların antibiyotik tedavisi esnasında hızla kültür pozitif hale gelmeleri, ikincisi ise başarılı bir lokal antimikotik tedavisinden 30 gün gibi kısa bir süre sonra %20-25 oranında kültür pozitif olguların saptanmasıdır. Bu durum, tedaviyle vajinadaki canlı mantar sayısının azalması ancak konvansiyonel kültür yöntemleri ile saptanamayacak kadar az sayıda patojen mikroorganizmanın vajinal lümende kalmasıyla açıklanmaktadır (Sobel, 2007).

Sonuç olarak, bazı kadınlarda tekrarlayan vajinal *Candida* kolonizasyonu olmaktadır. Burada kaynak ne olursa olsun, hastanın sistemik veya bölgesel vajinal savunma mekanizmaları ile mikroorganizmanın virulansı ve tedaviye direnci de önemli etkenlerdir. Bazı *Candida* türleri VVK oluşumunda önemli bir virulans faktörü olabilecek asit proteinaz salgırlar. Bu enzim tekrarlayan vulvovajinal *Candida* enfeksiyonu olan kadınların vajinal sıvılarında daha fazla saptanmıştır ve patogenezi izah etmek için kullanılabilir (Sobel, 2007).

2.7.3. Tanı

VVK'da en sık görülen semptom kaşıntıdır. Genellikle kokusuz koyu kıvamlı, beyaz renkli ve "peynir kesiği" görünümünde akıntı tipik muayene bulgusudur. Vajina hiperemik, vulva eritematöz görüntüde, serviks genelde normaldir. Vajinal hassasiyet, irritasyon, cinsel ilişki esnasında ağrı, vulvar bölgede kızarıklık ve yanma hissi, özellikle idrar yaparken yanma diğer semptomlardır. Tekrarlayan VVK'da ise kaşıntının yerini daha çok vajinada yanma hissi alır. Her ne kadar muayene bulguları ve semptomlara bakarak tanı konulabilse de laboratuvar ve

kültür ile desteklemeden tedaviye gitmek yanıltıcı olabilir. Sadece semptomlara bakılarak VVK tanısı konulan hastaların %25'inde uygulanan ilk tedavi başarılı olmamaktadır.

Bazı hastalarda tek bulgu hafif kaşıntı ve akıntı olabilir. Bu hastalarda mutlaka %10'luk KOH ile mikroskopik inceleme yapılmalı ve sonuç negatif olsa bile hastanın şikayetleri devam ediyorsa kültür yapılmalıdır. *Candida* kökenleri için en uygun kültür ortamı SDA (Saboraud Dextrose Agar) besiyeridir. Bazen servikovajinal sürüntü preparatı da tanıda yardımcı olabilir. Kültür pozitif hastaların preparatlarında %80 oranında *Candida* enfeksiyonunu düşündüren bulgu saptanabilmektedir. Tüm bu tanı yöntemlerine rağmen tekrarlayan VVK tanısı almış hastaların oldukça büyük bir kısmında tanı hatası olduğu ve yanlış tedavi nedeniyle sonuç alınmadığı bilinen bir gerçektir. Bu nedenle hastalar mutlaka kesin tanı konulduktan sonra uygun tedavi ajanları ile tedavi edilmeli, sadece muayene bulgularına bakılarak ampirik tedaviden kaçınılmalıdır (Sobel, 2007).

2.7.4. Tedavi

CDC'nin 1993 yılında yayınladığı VVK tedavi rehberinde azollerin kullanımı yer almaktadır. Sistemik kullanılan azoller; imidazoller (mikonazol ve ketakonazol) ve triazol (itronazol ve flukonazol) olarak iki ana grup altında incelenirler. Bu ilaçlar topikal veya oral kullanılabilirler. Bu ilaçlar mantar hücrelerinin membranlarındaki ana sterol olan ergosterol sentezini inhibe ederek etkilerini gösterirler. VVK tedavisinde kullanılan topikal ilaçlar ise vajinal supozituar veya krem şeklinde piyasada bulunmaktadır (Usluer, 2008).

Tekrarlayan VVK tedavisinde ilk basamak altta yatan herhangi bir predispozan faktörün olup olmadığının saptanması ve varsa ortadan kaldırılmasıdır. Eğer mümkünse immunosupressif ilaçların ve hormonların kullanımı kesilmelidir. Bu hastalarda düşük doz oral kontraseptiflerin kesilmesi tartışmalıdır. Yine premenopozal hastalarda oral glukoz tolerans testi yapılması çok anlamlı değildir ve nadiren diabetes mellitus saptanır. Bu hastalara daha rahat ve sentetik olmayan,

pamuklu iç çamaşırı giymeleri, çok sıkı kıyafetlerden kaçınmaları, perineyi mümkün olduğunca kuru tutmaları, vajinal temizlik amacıyla hiçbir kimyasal madde ve sabun kullanmamaları, tuvalet sonrası temizliklerini önden arkaya doğru yapmaları önerilmelidir. Her ne kadar cinsel eş tedavisi tartışmalı olsa da gerektiğinde eşin antimikotik ilaçlarla tedavi edilmesi ve tedavi tamamlanana kadar kondom kullanılması uygun görülmektedir. Yine reenfeksiyonu önlemek için iç çamaşırları kaynatılmalıdır. Bu hastaların yeterli ve uygun beslenmeleri, egzersiz yapmaları, sigarayı bırakmaları ve vitamin takviyesi yapmaları immune sistemlerini güçlendireceğinden tedavide faydalı olacaktır. Özellikle adet öncesi bir haftalık dönem enfeksiyon açısından riskli dönemdir. Bu dönemde daha dikkatli olunmalıdır (Sobel, 2007).

2.8. *Candida* Enfeksiyonlarının Tanısı

Candida enfeksiyonlarının tanısında klinik örneklerin nativ preperatla veya boyalı olarak mikroskopik incelemesi ile mikroorganizmaların tanımlanmasına yönelik olarak kültür yöntemleri uygulanır.

2.8.1. Mikroskopik inceleme

Candida kökenleri 3-6 µm büyüklüğünde oval ve yuvarlağımsı, tomurcuklanan hücreler olarak görülürler. Gram boyası ile Gram-pozitif olarak boyanırlar. Steril bölgelerden alınan yaymalarda maya hücrelerinin görülmesi, kandidoz tanısı için önemli olmakla birlikte duyarlılığı düşüktür. Mikroskopik değerlendirme öncesi %10'luk potasyum hidroksit (KOH) kullanılması, epitel hücrelerinin lizise uğramasını sağlayarak, daha iyi tespit edilmesini sağlar. Preperatlar faz-kontrast veya normal ışık mikroskopunda değerlendirilir. Işık yoğunluğunun azaltılmasıyla maya ve hifler daha iyi şekilde saptanabilir. Mantar hücre duvarını daha iyi görebilmek için mavi-siyah mürekkep KOH preparasyonuna katılabilir. Kalkoflor beyazı ile boyama, fungusların tespiti için duyarlı bir metottur ancak floresan

mikroskop gerektirir. Kullanılan filtreye göre maya hücreleri, psödohifler ve hif yapıları tebeşir beyazı veya parlak elma yeşili renginde floresans verir. Kalkoflor beyazına alternatif boyama, gram boyama (fungal elementler gram-pozitif boyanırlar) ve germ tüp testidir. Germ tüp testi serumda, 37°C'de 2 saat inkübe edildiğinde *C.albicans*'ı, hifal element oluşumunu gösterme yoluyla *albicans* dışı kökenlerden ayırmaya yarayan testtir. *C. albicans* izolatlarının %90'ından fazlası bu süre içinde germ tüp (gerçek hif) oluşturur. Blastokonidya (tomurcuklanmış mantar), hifa ve psödohifanın gösterilmesi, doku invazyonunu kuvvetle destekler ancak tanısal değildir. Doku incelenmesinde hematoksilen eozin, periyodik asit-schiff (PAS) ve Gomori'nin metenamin gümüş boyası tanıda yararlıdır. Derin dokuların biyopsi örneklerinde mayanın görülmesi kandidozun kesin tanısını sağlar (Murray, 2007).

2.8.2. Kültür

Mantarların kültürde üretilmesi enfeksiyonun tanısının konmasında ve etkenin belirlenmesi için çoğu zaman şarttır. *Candida* kökenleri hem normal floranın üyesi hem de patojen olarak bulunabilmelerinden dolayı tüm kültür sonuçları hastanın klinik, histopatolojik ve radyolojik bulgularıyla birlikte değerlendirilmelidir.

İnvaziv kandidozdan şüphelenilen hastaların incelemesi, balgam, orofarinks, dışkı, idrar, dren yerleri ve kan kültürlerinin alınmasıyla başlar. Örnekler genellikle bir seçici, bir de seçici olmayan (beyin-kalp infüzyon agar, sabouraud dekstroz agar gibi) besiyerine ekilir. *Candida* kökenlerinin ilk izolasyonu ve identifikasyonunda kromotojenik besiyerleri (CHROM agar *Candida*, BD CHROMagar *Candida*, *Candida* DI) oldukça kullanışlıdır ve *albicans* ile *albicans* dışı kökenleri birbirinden ayırabilir. Bifazik besiyeri kullanımı da kandan izolasyonu kolaylaştırabilmektedir (Stevens, 2002; Verweij, 2000).

Radyometrik yöntemlerin kültür sistemlerinde uygulanması ile, mantarların erken tanısının sağlanabileceği bazı çalışmalarda gösterilmiştir. BACTEC ve BacT/Alert yöntemleri, kan kültürlerinde mantarların tespitini hızlandırmıştır (Hopfer, 1980).

2.8.3. Seroloji

İnvaziv kandidoz tanısında kültür yöntemlerinin çok duyarlı olmayışı araştırmacıları serolojik testler geliştirmeye yönlendirmiştir. Serolojik yöntemler, özellikle duyarlı görüntüleme teknikleri ile birlikte tarama araçları olarak kullanıldıklarında, invaziv fungal hastalıkların erken ve hızlı tanısına yardımcı olmaktadır (Maertens, 2007).

İnvaziv kandidozların serolojik tanısında mannan (CAND-TEC, Ramco Laboratories, Inc., Houston) ve mannoprotein (Bichro-latex albicans) antikorlarını tespit eden testler kullanılmış ancak bu antikor tarama testleri yüz güldürücü sonuçlar vermemiştir. Sadece kolonizasyon olması durumunda bile antikorların saptanması ve immünsüpre hastalarda invaziv kandidozda bile antikor oluşmaması testlerin duyarlılığını düşürmektedir. Kandidoz kliniği bulgularının varlığında, ardışık alınan serumlarda antikor titresinin artmaya devam etmesi enfeksiyon lehine değerlendirilebilir. Ayrıca antijen testleri ile birlikte değerlendirildiklerinde tanıya yardımcı olabilirler (Yeo, 2002; Willinger, 2006).

Serumda veya vücut sıvılarında mantar antijenlerinin veya metabolitlerinin aranmasına yönelik testler invaziv mantar enfeksiyonlarının serolojik tanısı için daha değerlidirler. Bu amaçla mannan, D-arabinitol, enolaz ve β -D-glukan araştırılmaktadır (Yeo, 2002). Günümüzde en yaygın kullanılan yöntem mannan antijen testidir (Willinger, 2006).

Mannan, *Candida* hücre yüzeyinin, enfeksiyon sırasında, dolaşıma geçen karbonhidratıdır. Dolaşımdan çabuk temizlenir ve kandaki düzeyi hızlı düşer. Bu nedenle saptanabilmesi için hastadan sık kan örneği alınması gerekir. Değişik çalışmalarda duyarlılık ve özgüllüğüne ilişkin farklı oranlar bildirilmektedir (Rimek, 2004).

D-arabinitol aslında bazı *Candida* kökenlerinin metabolik ürünüdür. Sistemik kandidozlu hastaların idrarında düzeyi artar. Test birden çok tekrarlanırsa, duyarlılık ve özgüllük artar (Lehtonen, 1996). *C. krusei* ve *C. glabrata* bu metaboliti üretmediklerinden bu iki etkenin enfeksiyonlarında saptanmaz (Yeo, 2002; Willinger, 2006).

Enolaz biraz daha ümit verici bir antijen testidir. Ardışık alınan kanlarda aranmasının duyarlılığı artıracağı kabul edilmektedir. Ayrıca enolazın *Candida* türlerine oldukça özgül olup yüzeysel kandidozlarda serumda saptanmaması bir avantajdır (McLintock, 2004).

Son yıllarda mantarın hücre duvarında bulunan 1,3-β-D-glukan düzeyinin saptanması, invaziv hastalık için bir yardımcı tanımlayıcı test olarak öne çıkmıştır. İnvaziv kandidozda, yüksek konsantrasyonlarda bulunmakla birlikte, türe özgül ayırım yapamamaktadır (Whiting, 2004; Ostrosky, 2005; Upton, 2006). Bu test, Cerrahi planlanan hastalarda, şüpheli kandidoz durumunda ampirik tedaviye karar verebilmek için yararlı olduğu bildirilmiştir (Segal, 2005; Ellepola, 2005).

Serolojik testlerin duyarlılık ve özgüllük oranları tablo 2.3.'de gösterilmektedir (Lange, 2010).

Tablo 2.3. Serolojik Testlerin Duyarlılık ve Özgüllük oranları

Serolojik testler	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
Mannan Ab*	53-100	89-100
Enolaz Ag**	72-85	96-100
D-arabinitol	88	91
B-D glukan	60-100	64-99

*Ab: Antikor, **Ag: Antijen

Moleküler tanı yöntemleri; tanı yanında cins veya tür düzeyinde *Candida*'ların tanımlanması, epidemiyolojik tiplendirme, virulans faktörlerinin belirlenmesi, antifungal direnç genlerinin araştırılması, mutasyon incelenmeleri, sınıflandırma ve filogenetik analizlerde kullanılmaktadır (Sullivan, 2002).

Moleküler tanı yöntemleri hibridizasyon “probe”larının kullanıldığı sinyal amplifikasyon yöntemleri ve nükleik asit amplifikasyon yöntemleri olmak üzere iki gruptur (Chemaly, 2006).

2.8.4. Nükleik asit amplifikasyon teknolojileri

2.8.4.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Bu amaçla özgül bir gen bölgesine uç kısımlarından homolog olan dizilerden oluşmuş bir çift sentetik oligonükleotid öncül (primer) ve termostabil *Taq* DNA polimeraz kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilir. Amplifikasyon için kullanılan hedef gen bölgeleri, 18S, 28S, 5.8S rRNA alt ünitelerine ait tüm mantarlar için ortak, çok tekrarlı, iyi korunmuş bölgelerin genleri ile "internal transcribe spacer"(ITS1, ITS2), sitokrom p450 lanosterol, 14- alfa-demetilaz, aspartik proteinaz, aktin, kitin sentetaz, ısı şok proteinini kodlayan gen bölgeleri olarak sayılabilir. Ayrıca rRNA genleri içerdikleri korunmuş ve değişken bölgeleri ile filogenetik analizler için uygun hedef bölgelerdir (Chemmalay, 2006).

Risk grubunda bulunan hastalar için daha kısa sürede sonuç alınan PZR yöntemi ile erken tanı konulup uygun tedaviye başlanması çok önemlidir. Kültüre dayalı yöntemlerle örneklerin çoğunda *Candida* saptanması için 48 saat, tür tanımlaması için genellikle ek bir 48 saat daha gerekmektedir. PZT ile ise daha kısa sürede sonuca ulaşıldığı bildirilmektedir (Sullivan, 2002).

Hızlı ve duyarlı olma özelliğine karşın PZR kullanılan malzemenin nispeten pahalı ve tekniklerin komplike oluşu, çok sayıda örneğe birden uygulanamaması gibi nedenler ile halen; kültür ve serolojik tanı gibi geleneksel uygulamaların önüne geçememiştir (Sullivan, 2002; Chemmalay, 2006).

Günümüzde ("real-time") gerçek zamanlı PZR veya daha yeni floresan teknolojileri olan floresan enerji transferi gibi yöntemler ile bir saatten kısa sürede sonuç alınabilmekte ve kontaminasyon önlenilmektedir (Chemmalay, 2006).

2.8.4.2. Sekanslama (Dizi Analizi)

Mantarların alternatif bir tanımlama yöntemi nükleik asit dizi analizi yöntemi olup, kültürde üremiş mantarların tanımlanması veya kan, doku gibi örneklerde etken

olan mantarların tanımlanması amacıyla kullanımı gittikçe daha çok önem kazanmaktadır (Chemmalay, 2006).

Geniş kapsamlı PZR ve dizi analizi yapıldıktan sonra elde edilen nükleik asit dizisi veri tabanından bilinen diziyle karşılaştırılır ve tanımlama yapılır. Yöntem teknik olarak karmaşık olup, gelişmiş laboratuvar olanakları gerektiren, pahalı bir yöntemdir. Ancak gelecekte kullanımı artacak ümit verici bir teknik olarak güncelliğini korumaktadır (Chemmalay, 2006).

Dizi analizi verileri ile mantarların tanımlanması ve diğer mantarlarla olan filogenetik ilişkisi belirlendiğinde tedavi için antifungal ilaçların seçimi akılcı olarak yapılabilmektedir (McGinnis, 2006).

2.8.5. Sinyal amplifikasyon teknolojileri

Nükleik asit hibridizasyon problemlerinin kullanıldığı bu yöntemler kültür doğrulaması için mikoloji laboratuvarlarında sık kullanılmaktadır. Mantarların tanımlanması için hazırlanmış ticari genetik problemlerin özellikle kültürde üremiş küflerin tanımlanmasında tanı değeri bulmaktadır (Sullivan, 2002).

2.9. Otomatize Sistemler

Candida'ların tür düzeyinde tanımlanması önemlidir. İnsanlarda enfeksiyona sebep olan pek çok mantar, antifungal ajanların pek çoğuna karşı başlangıçta doğal dirençli olabileceği gibi kullanım sonrasında da direnç geliştirebilmektedir. Bu invaziv enfeksiyonların uygun tedavisi çoğunlukla etiyolojik ajanın hızlı ve doğru tanımlanmasına bağlıdır. Örneğin *C. lusitaniae*, amfoterisin B'ye *in vitro* dirençli olabilirken, *C. glabrata* ve *C. krusei* fluconazole dirençli bulunabilmektedir. *Candida* kökenlerinin antifungal duyarlılıkları tablo 2.4.'de bildirilmiştir (Peter, 2009).

Tablo 2.4. *Candida* Türlerinin Antifungal Duyarlılıkları

Fungus türü	Flukonazol	Itrakonazol	Vorikonazol	Posakonazol	Kandinler	AmfoterisinB
<i>C.albicans</i>	H	H	H	H	H	H
<i>C.glabrata</i>	DBH-D	DBH-D	DBH-D	DBH-D	H	H-OH
<i>C.tropicalis</i>	H	H	H	H	H	H
<i>C.parapsilosis</i>	H	H	H	H	H	H
<i>C.krusei</i>	D	DBH-D	H	H	H	H-OH
<i>C.lustaniae</i>	H	H	H	H	H	H-D

H: duyarlı; DBH: hassas-doza bağımlı; D: dirençli; OH: orta hassas

Mantar enfeksiyonlarının insidansının artması bu patojenlerin tanımlanması için hızlı ve doğru manuel ve otomatize ticari sistemlerin geliştirilmesini gerektirmiştir. Bu otomatize sistemlerden ID 32C sistemi (bioMerieux Marcy l’Etoile, France) genellikle Avrupa ülkelerinde kullanılırken, API 32C mantar identifikasyon sistemi (bioMerieux Vitec, Inc., Hazelwood, Mo.) ABD’nde en sık kullanılan mantar tanımlanma sistemlerinden biridir (Banerjee, 1991).

2.10. Antifungal Duyarlılık Testleri

Tek antifungal ajanın amfoterisin B olduğu dönemlerde, antifungal duyarlılık testleri gerekli görülmemiştir. Ancak günümüzde amfoterisin B dışında yeni antifungal ajanların geliştirilmesi, *Candida* kökenlerinde, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* ve *Aspergillus terreus* kökenlerinde mortaliteyi etkileyebilecek direnç belirlenmesi mantarlar için de bakterilerde olduğu gibi anlamlı sonuç verebilecek duyarlılık testlerinin uygulanmasına neden olmuştur. Antifungal ile mantar etkileşiminin in vitro olarak incelenebilmesi mikolojide önemli bir adım olmuştur. Bu amaçla CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, eski adıyla NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards) tarafından geliştirilen mikrodilüsyon yöntemi (M27-A2 ve M38-A) ile bu yöntemin EUCAST (European Confederation of Amicrobial Susceptibility Testing) tarafından modifiye edilen şekli referans yöntem olarak kullanılmaktadır (CLSI, 2002).

Candida 'ların antifungal duyarlılığının belirlenmesinde germ-tüp, flow sitometri, agar ve buyyon dilüsyon yöntemleri gibi birçok yöntem kullanılmaktadır. Agar dilüsyon yöntemleri kolay ve ucuz olduğundan, cazip görünmekle birlikte sonuçların inokulum miktarı, sıcaklık, inkübasyon süresi ve iyi erimeyen antifungallerin agara diffüz yayılmaması gibi birçok faktörle etkilenmesi sorun yaratmaktadır. Buyyon ile yapılan mikro ve makro dilüsyon yöntemleri yaygın olup, CLSI tarafından standadize edilmiştir. Bu yöntem günümüzde sadece *Candida* ve *Cryptococcus* kökenleri için önerilmektedir. Sonuçlar aynı laboratuvar için ve değişik laboratuvarlar arasında uyumlu sonuçlar sağlamakla birlikte, bu sonuçlar klinik cevapla uyumlu olmayabilir. CLSI'nin antifungal ajanlar için belirlediği MİK değerleri tablo 2.5'de gösterilmiştir (Morace, 2002).

Candida kökenleri için kullanılan diğer duyarlılık testleri; makro ve mikrodilüsyon yöntemi, kolorimetrik yöntem ve E-Test'tir.

2.10.1. Makro ve mikrodilüsyon yöntemi

Candida 'ların duyarlılığı için günümüzde önerilen referans yöntem CLSI'nin M27-A3 ekinde yazan kriterler gibi uygulanmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntem amfoterisin B direncini tespit etmede yetersizdir. Referans yöntem esas olarak makrodilüsyon yöntemi olarak tanımlanmış, daha sonra mikrodilüsyon yönteminin avantajları nedeniyle bu yöntem tercih edilmiştir. Bu yöntemle klinikte kullanılan tüm antifungaller test edilebilmektedir. CLSI yöntemiyle bazı *Candida* izolatlarının direnç takip değerleri halen sorunludur. Örneğin; bir suş 24 saatteki MİK düzeyi ile duyarlı ($\leq 1\mu$ g/ml) bulunurken, 48. saatteki MİK düzeyi ile dirençli ($\geq 64\mu$ g/ml) rapor edilmektedir (Cuenca-Esterella, 2003; Espinell-Ingroff, 2005).

2.10.2. Kolorimetrik yöntemler

MİK değerlerinin saptanmasında bulanıklığın görsel olarak değerlendirildiği standart duyarlılık testlerinin yeni bir alternatifi, kolorimetrik indikatörlerin veya floresan

boyaların kullanılmasıdır. Antifungal duyarlılık testi için, ticari (Sensititre YeastOne ve FUNGITEST) ya da ticari olmayan (tetrazolyum tuz yöntemleri ve substrat kapma indikatörleri) yöntemler uyarlanmıştır (Espinell-Ingroff, 2004).

Kolorimetrik yöntemlerle elde edilen MİK değerlerinin, referans mikrodilüsyon ve makrodilüsyon yöntemleriyle elde edilen MİK değerleriyle uyumu oldukça iyidir. Ancak kolorimetrik yöntemlerle elde edilen itrakonazol MİK değerlerinin, CLSI yöntemleriyle elde edilen MİK değerlerinden daha yüksek bulunmuştur. *C. glabrata* ve *C. tropicalis*'te flukonazolle uyum düşük bulunmuştur (Espinell-Ingroff, 2003).

2.10.3. E-test

Bakteriler için çok başarılı sonuç veren bu yöntemde, antimikrobiyal ajan belirli ve giderek çoğalan miktarlarda plastik bir şerit üzerine emdirilir, daha sonra ekim yapılmış agar üzerine yerleştirilir. Giderek azalan inhibisyon zonu derecelendirilerek işaretlenmiş şerit üzerinden ilaç konsantrasyonu olarak okunur (Murray, 2007).

Tablo 2.5. CLSI'e Göre MİK Değerleri

Antifungal ilaç	H	OH	D
Flusitozin	<4	8-16	>32
Amfoterisin B*	T	T	T
Flukonazol			≥4
Itrakonazol	≤0,125	0,25-0,5	≥1
Vorikonazol	≤ 1	2	≥4

T: Tanımlanmamış, H: Hassas, OH: Orta hassas, D: Dirençli *Amfoterisin B için ≥1 mg/l değerler direnci telkin etmektedir

CLSI'nin 2011 ek'ine göre flukonazol etken maddesine; *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* için direnç üst sınırı 4 mg/ml, *C. glabrata* için 32 mg/ml olarak ilan edilmiştir.

2.11. *Candida* Kökenlerinde Antifungal İlaçlar ve Direnç Mekanizmaları

Mantarlar, pek çok karmaşık mekanizma ile antifungallere direnç geliştirebilirler. Kullanımda olan antifungaller, polienler (amfoterisin B; konvansiyonel ve lipid formülleri), floro-pirimidinler (flusitozin), azoller (ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol), ekinokandinler (kaspofungin, mikafungin) ve alilaminler (terbinafin) dir (Sobel, 2007).

Antifungal direnç, üç başlık altında incelenir: Primer (intrinsik), sekonder (kazanılmış) ve klinik. Primer direnç antifungal temas öyküsü yokken kalıtımla gelen dirençtir. Sekonder direnç uzun süreli bir antifungal kullanım sonucu olarak, önceden duyarlı olan bir izolatın dirençli bir fenotip geliştirmesiyle ortaya çıkar.

Klinik direnç laboratuvar testlerine göre hassas olduğu bilinen antifungal kullanımına rağmen hastalığın ilerleyici olması ya da relaps göstermesi durumu olarak tanımlanmaktadır. Bu durum tipik olarak persistan, derin immün yetmezlik durumları (AIDS, nötropeni gibi) enfekte prostetik materyal varlığında söz konusu olmaktadır (Sobel, 2007).

İnvaziv *candida* enfeksiyonunda kullanımda olan antifungal ilaç grupları etki mekanizmaları ve direnç özellikleri aşağıda sıralanmıştır:

2.11.1. Amfoterisin B ve lipid formülasyonları

Amfoterisin B, hidrofilik bir polihidroksil zinciri ile lipofilik bir polyen hidrokarbon zinciri içeren amfoterik bir bileşiktir. Fungisidal etkisini mantar hücre membranında bulunan başlıca sterol olan ergosterole bağlanarak gösterir. Bu bağlanma, membranın ozmotik bütünlüğünü bozar ve ardından bu olay intrasellüler potasyum, magnezyum, şeker ve metabolitlerin hücre dışına kaçışı ve mantar hücresinin ölümü ile sonuçlanır (Sobel, 2007).

Bu mekanizmanın dışında, amfoterisin B'nin mantara karşı olan antifungal etkisinde amfoterisin B'nin neden olduğu oksidatif hasarın da rolü olabileceği ileri sürülmüştür (Sobel, 2007).

Funguslar nadiren membran ergosterol içeriğini azaltarak ya da ergosterole bağlanma noktasını değiştirerek amfoterisin B'ye direnç geliştirebilir (polyen direnci). Amfoterisin B'ye doğal direnç *C. krusei* ve *C. lusitaniae*'da vardır. Fungisidal etkili Amfoterisin B'ye karşı kazanılmış direnç oluşumu nadirdir. Çoğunlukla inatçı ve tekrarlayan sistemik mantar enfeksiyonlarının tedavisi için, tekrarlayan dozlarda Amfoterisin B almış kanser hastalarından izole edilen mayalarda ortaya çıkar. Kanser hastalarına ait mayaların Amfoterisin B'ye karşı MİK değerleri, kontrollerden alınan ve kolonizasyon oluşturan izolatların MİK değerleri ile karşılaştırıldığında yüksek bulunmuştur (Young, 2003).

2.11.2. Triazololler (flukonazol, itrakoazol, vorikonazol, posakonazol)

Bu bileşikler üç nitrojenli azol halkası içerirler. Tüm azol bileşikleri, sitokrom P-450 14 α -demetilaz enzimini inhibe ederek antifungal etki gösterir. Bu enzim, lanosterolden ergosterol sentezinde rol alan bir enzimdir. Ergosterol sentezinin inhibisyonu mantar hücre membran sentezinin sonlanmasıyla sonuçlanır. Azol gruplarına direnç gelişimi önemli bir sorundur. Direnç mekanizmaları efluks pompası ile ilacın dışa atılımının artması yanında C 14 α -demetilazda değişme veya artmadır. Bu enzim ERG11 geninin bir ürünü olup bu gendeki bazı değişiklikler direnç mekanizması ile ilişkili bulunmuştur. Bu değişiklikleri kodlayan bölgelerdeki nokta mutasyonlar, genin aşırı ekspresyonu, genin çoğalması ve genin konversiyonu veya mitotik rekombinasyonudur. *C.krusei* azollere doğal dirençlidir. Ayrıca birçok *C. glabrata* kökeni doğal dirençli veya doza bağımlı duyarlıdır. Kazanılmış azol direnci, özellikle triazololler ile uzun süreli profilaktik tedavi alan HIV'li (Human Immune deficiency Virus) hastalardan izole edilen *C. albicans* kökenlerinde sık görülmektedir (MacPherson, 2005).

2.11.3. Antimetabolitler (flusitozin)

Flusitozin florlanmış bir primidin olup antimetabolit olarak etki gösteren tek ilaçtır. Flusitozin, primidin metabolizmasını bozarak ve böylece mantar hücresindeki DNA, RNA ve protein sentezini engelleyerek antifungal etki gösterir. *C.albicans*'ın klinik izolatlarının %10 kadarı flusitozine doğal olarak dirençlidir ve duyarlı izolatların %30'u ise direnci tedavi sırasında kazanır. Bu durumun yaygın görülmesi sebebi ile kandidemi tedavisinde flusitozin monoterapisi nadiren kullanılır. Direnç, 5 flusitozini 5- fluorourasile dönüştüren sitozin deaminaz, nükleik asit sentezi için önemli olan urasil fosforiboziltransferaz veya iki püri-sitozin permeazdan herhangi biri ile ilişkilendirilebilir (Pujol, 2004).

2.11.4. Ekinokandinler (kaspofungin, mikafungin, anidulafungin)

Geniş etki spektrumuna sahip lipopeptit yapısındaki bileşiklerdir. Ekinokandinler glukan sentezini inhibe ederek mantarın hücre duvarı sentezini inhibe eder. Ekinokandinlerin ilk üyesi olan kaspofungin klinik olarak son yıllarda kullanıma girmiştir ve bu nedenle de kaspofungine dirençli izolatların sayısı kısıtlıdır. In vitro olarak, direnç genellikle hedef enzim olan glukan sentetazı kodlayan genlerdeki ve hedef ile etkileşimde olan proteinlerdeki mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar. *C. albicans*'da eflüks pompası geni olan CDR2 genini aşırı eksprese eden kökenlerin, kaspofungine karşı direnç sergileyebileceklerine dair bazı bulgular vardır (Schuetzler, 2003).

2.12. Bor Minerali

Bor, periyodik tabloda B simgesi ile gösterilen, atom numarası 5, atom ağırlığı 10,81 olan metalle ametal arası yarı iletken özelliğe sahip bir elementtir. Bor tabiiatta hiçbir zaman serbest halde bulunmaz. Doğada yaklaşık 230 çeşit bor minerali olduğu bilinmektedir. Çeşitli metal veya ametal elementlerle yaptığı bileşiklerin gösterdiği farklı özellikler, endüstride birçok bor bileşiğinin kullanılmasına olanak

sağlamaktadır. Bor, bileşiklerinde metal dışı bileşikler gibi davranır, ancak farklı olarak saf bor, karbon gibi elektrik iletkenidir. Kristalize bor görünüm ve optik özellikleri açısından elmasa benzer ve neredeyse elmas kadar serttir (www.boren.gov.tr).

Bor, insan vücudu tarafından az miktarlarda ihtiyaç duyulan, hücrelerde sentezlenemediği için besinlerle dışarıdan alınması gereken önemli bir besleyicidir. 1981 yılına kadar bor elementinin insanlar üzerinde bir etkisinin olmadığı düşünülmekte idi. Bu yıldan sonra yapılan çalışmalarla borun, birçok tedavi için vazgeçilmez bir element olduğu ve insan gelişiminde düşünülenin tam aksine etkin olduğu belirlenmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından günlük 2 – 3 mg B alınması önerilmektedir (www.boren.gov.tr).

Ulusal Bor Enstitüsü, günlük maruz kalınan bor değerinin 6.48 mg B/ gün olduğu saptanmıştır. Henüz tehlikeli olan üst limit bor ve türevleri için kesin olarak belirlenmemekle birlikte DSÖ bu değeri 13 mg /gün olarak yayınlamıştır. Avrupa Birliği (AB), bor madeninin; tehlikeli maddelerin sınıflandırılması, paketlenmesi ve etiketlenmesine ilişkin 67/548/EEC sayılı direktif çerçevesinde “Kategori 2” altında “üremeye olumsuz etkili toksik madde” olarak sınıflandırılması kararı almıştır. Ancak çalışmalarda baz alınan limit değerlere insanların maruz kalması mümkün değildir. Söz konusu maruziyet en fazla bor madenlerinde ve bu sektörde çalışan işçilerde soluma yolu ile olabilir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesine (EFSA) ait raporlar incelendiğinde sudan ve gıdalardan alınabilecek bor miktarının Avrupa Birliği limit değerlerini aşamayacağı yorumu bulunmaktadır (www.boren.gov.tr).

2.12.1. Bor ürünleri

Bor mineralleri ve bunlardan elde edilen ticari ürünlerin gruplandırılması konusunda literatürde kesin bir sınıflandırma bulunmamaktadır. Bor üretim ve tüketimi ile dünya ticareti konusundaki kaynaklar da oldukça sınırlıdır. Bu konudaki en önemli kaynaklardan biri Roskill Information Services Ltd.dir. Bu şirketin 3 yılda bir

yayınladığı bor raporlarında. Bor rezervi oluşumları; tabii bor mineralleri (boron minerals), bunlardan elde edilen zenginleştirilmiş rafine ürünler (boron compounds) ve özel bor kimyasalları (boron products) olarak adlandırılmaktadır (www.boren.gov.tr).

Doğal Bor Ürünleri

Üleksit Tinkal Kolemanit

Rafine Bor Ürünleri

Borik Asit

Boraks Pentahidrat

Boraks Dekahidrat

Etibor-48

Sodyum Perborat Tetrahidrat

Sodyum Perborat Monohidrat

Susuz Boraks

Özel Bor Kimyasalları

Susuz Borik Asit

Disodyum Oktaborat Tetrahidrat

Çinko Borat

2.12.2. Uygulama alanları (www.boren.gov.tr).

Cam Sanayi: Borosilikat camları, izolasyon cam elyafı, tekstil cam elyafı, optik lifler, cam seramikleri, şişe ve diğer düz camlar,

Seramik Sanayi: Emaye, sır, sırça, porselen boya ları,

Nükleer Sanayi: Reaktör kontrol çubukları, nükleer kazalarda güvenlik amaçlı ve nükleer atık depolayıcı olarak, uzay ve havacılık sanayi: sürtünmeye- aşınmaya ve ısıya dayanıklı malzemeler, roket yakıtı katkı malzemeleri, askeri & zırhlı araçlar: Zırh plakalar, kompozit malzemeler,

Elektronik-Elektrik ve Bilgisayar Sanayi: Bilgisayarların mikro çiplerinde, CD-sürücülerinde, bilgisayar ağlarında; ısıya-aşınmaya dayanıklı fiber optik kablolar, yarı iletkenler, vakum tüpler, dielektrik malzemeler, elektrik kondansatörleri, gecikmeli sigortalar,

İletişim Araçları: Cep telefonları, modemler, televizyonlar,

İnşaat-Çimento Sektörü: Mukavemet artırıcı ve izolasyon amaçlı olarak,

Metalurji: Paslanmaz ve alaşımlı çelik, sürtünmeye-aşınmaya karşı dayanıklı malzemeler, metalurjik flaks, refrakterler, briket malzemeleri, lehimleme, döküm malzemelerinde katkı maddesi olarak, kesiciler, aşındırıcılar,

Enerji Sektörü: Hidrojen taşıyıcı, güneş enerjisinin depolanması, güneş pillerinde koruyucu olarak,

Otomobil Sanayi: Hava yastıklarında, hidroliklerde, plastik aksamda, yağlarda ve metal aksamlarda, ısı ve ses yalıtımı sağlamak amacıyla, antifrizler,

Tekstil Sektörü: Isıya dayanıklı kumaşlar, yanmayı geciktirici ve önleyici selülozik malzemeler, izolasyon malzemeleri, tekstil boya ları, deri renklendiricileri, suni ipek parlatma malzemeleri,

İlaç ve Kozmetik Sanayi: Dezenfekte ediciler, antiseptikler, diş macunları,

Tıp: Osteoporoz tedavilerinde, alerjik hastalıklarda, psikiyatride, kemik gelişiminde ve artiritte, menopoz tedavisinde, beyin kanserlerinin tedavisinde,

Kimya Sanayi: Bazı kimyasalların indirgenmesi, elektrolitik işlemler, flotasyon

ilaçları, banyo çözeltileri, katalistler, atık temizleme amaçlı olarak, petrol boyaları, yanmayan ve erimeyen boyalar, tekstil boyaları,

Temizleme ve Beyazlatma Sanayi: Toz deterjanlar, toz beyazlatıcılar, parlaticılar,

Tarım Sektörü: Gübreler, böcek-bitki öldürücüler,

Kağıt Sanayi: Beyazlatıcı olarak,

Koruyucu: Ahşap malzemeler ve ağaçlarda koruyucu olarak, boya ve vernik kurutucularında,

Mıknatıslar, fotoğrafçılık, kompozit malzemeler, spor malzemeleri, manyetik cihazlar, mumyalama

2.12.3. Bor madeninin tıpta kullanımı

Bor periyodik cetvelde C elementinden hemen önce gelir; bu nedenle C elementine benzer davranışlar sergiler. C ve O elementleriyle farklı bileşikler oluşturur, bu özelliği sayesinde lipidler, şekerler, organik asitler ve alkollerle ilişki kurar (Rezanka, 2008).

Bor madeninin şu anda tıpta kullanılan tek formu borik asit ve tuzlarıdır. Boronik asitler; hidrokarbon ve alkolden oluşan bileşiklerdir. Bu nedenle, in vivo metabolizmaları veya kimyasal degradasyonları endişe yaratmaz. Şu ana kadar borik asit esterlerinden hiçbirine ait toksite gösterilememiştir. Pek çoğu piyasadan rahatlıkla elde edilebilir (Groziak, 2001).

Memeli hücrelerinde bor mineralinin rol aldığı özel bir fonksiyon henüz gösterilememiştir. Ancak diyetlerine bor eklenen kişilerde aşağıdaki olumlu etkiler gözlemlenmiştir.

- 1- Plazma steroid hormonlarında artış (Samman, 1998)
- 2- Plazma lipid metabolitlerinde artış (Armstrong, 2000)
- 3- Kemik gücünde artış (Armstrong, 2000)
- 4- Osteoartritli hastalarda klinik iyileşme (Naghii, 1993, Gaby, 1999)

- 5- Atletlerde kas kitlesinde artış (Clarkson, 1999)
- 6- Dental patolojilerin tedavisi (Nielsen, 2000)

Bu etkilerinin dışında; beyin fonksiyonları, fizyolojik fonksiyonlarda ve genetik regülasyonda rol alabileceği söylenmektedir (Fusayama, 1997; Barr, 1996).

Boron (borik asit esterleri ve tuzları); şarap, kuru üzüm, çam fıstığı ve fındıkta bol miktarda bulunur. Ancak insanlar, daha fazla tükettikleri için, bor elementini en fazla; süt, kahve ve sudan alırlar. FDA; günlük borik asit veya tuzlarının tolere edilebilir miktarını 20 mg/gün'e yükseltmiştir (Rainey, 1999).

Borik asit toksitesi için kişinin çok yüksek konsantrasyonlara maruz kalması veya günlük idrar çıkışında problem olması gerekir (Litovitz, 1988; Restuccio, 1992). Borik asit serum proteinlerine sıkı bağlanmaz, ekstra vasküler alana hızla geçip, dokulara akümüle olmadan glomerüler filtrasyonla atılır (Groettrup, 1999).

Borik asitin tıpta kullanılmasının en temel nedeni proteinlerle kurduğu bağlardır. Kurulan bu bağlardan yararlanarak, aşağıdaki ilaçların geliştirilmesine çalışılmaktadır.

2.12.3.1. Proteosom inhibitörleri

Boronik asitler, açıl guplarının transferinde rol alan enzimleri, özellikle de hidrolazları; kimotripsin, tripsin, trombin ve diğer proteazları inhibe eder. Bu etkiyi, proteazların aktif bölgesine, özellikle de serin rezidülerine bağlanarak gösterirler (Groziak, 2001).

Proteosom hücrelerdeki major non-lizozomal endoproteazdır. MHC-classI proteinleri ile antijenik peptidler arasında bağ kurar. Proteosom inhibitörleriyle sitotoksik T hücrelerinin inhibe edilmesi ve bu yolla transplant rejeksiyonu, otoimmün hastalıkların tedavisin denenmektedir (Groettrup, 1999).

20S proteosom mantarlardan insanlara kadar tüm ökaryotlarda, iyi korunmuş ortak bir bölgedir. ZL3B, bu proteosomun inhibitörüdür (Myung, 2001).

Proteosomun inhibe edilmesi kanser tedavisinde de kullanılmaktadır. Dipeptid bir boronik asid olan PS-341 (Bortezomib-Velcade) ilk uygulamaya giren proteosom inhibitörüdür. Multipl myelom tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Adams, 1998).

Proteosom, hücre içinde yanlış yapılandırılmış ve ibukutinle işaretlenmiş proteinlerin yıkılmalarını sağlar. Regülatör proteinlerin ubikitin aracılı yıkımı, hücre siklus progresyonu, sinyal ileti, transkripsiyonel düzenleme ve apoptozis gibi metabolik olayların kontrolünde önemli rol oynar. Alzheimer patogenezinde rol oynayan β -amiloid peptidin yıkılması da bu yolla olduğundan, bu hastalığın tedavisinde de proteosom inhibitörlerinin kullanılması düşünülmektedir (Christie, 1999).

2.12.3.2. Antikoagülanlar

Antikoagülanlar sınıfına, heparin ve warfarine ek olarak, tripsin gibi birer proteaz olan trombin ve koagülasyon faktör Xa'yı inhibe eden; boronik asitler de katılmak üzeredir (Ac-(D)Phe-Pro-boroArg-OH). Faktör Xa bir koagülasyon faktörü olmasının yanında aynı zamanda pro-inflamatuar yanıtlarda rol oynar. Bu faktörün inhibisyonu inflamasyonu da baskılayacaktır (Vacca, 2000; Lee, 1997).

2.12.3.3. Dipeptidil peptidaz inhibitörleri

Bir serin proteaz olan dipeptidil peptidaz IV (DP IV), insan T lenfositlerinin yüzeyinde sentezlenir. Dinlenme halindeki T lenfositlerde bulunmazken, aktive T lenfositlerde güçlü şekilde sentezlenip, onların baskılanmasına neden olur. DP IV inhibitörlerinin T lenfositlerin proliferasyonunu da baskıladıkları gösterilmiştir. Boronik asit türevi olan, Proboro Pro adlı molekül bu enzimi nanomolar konsantrasyonlarında inhibe edebilmektedir (Coutts, 1996).

2.12.3.4. INS (1,4,5) P₃ reseptör inhibitörleri

Boronik asit esteri olan, 2-aminometil difenil borinatın inositol 1,4,5-trifosfat reseptörlerinin modülatörü olduğu gözlenmiştir. 2-APB, bu sayede, hücre içi Ins P₃ aracılı, kalsiyum salınımını inhibe eder. Bu yolla salınan kalsiyum, suprakiazmatik nükleusta etkili olup, memeli hücrelerinin sirkadyen ritmini etkiler. Bu nedenle 2-APB molekülünün yakın gelecekte uyku bozukluklarının tedavisinde etkili olacağı düşünülmektedir (Maruyama, 1997).

2.12.3.5. Östrojen analogları

X-ray kristal yapılarının incelenmesi sonucu, heterosiklik yapıdaki bazı borik asit türevlerinin, östradiol ve östronda bulunan A-aromatik halkasına veya Premarinde bulunan AB-aromatik halkasına benzerliği dikkati çekmiştir. Bu durum gelecekte östrojen replasman tedavisinde ve post menopozal kadınların kardiovasküler problemlerinin ve osteoporozun önlenmesinde umut vaat etmektedir (Groziak, 2001).

2.12.3.6. Boron nötron yakalama terapisi (BNCT)

BNCT; bor izotoplarının nötronlara karşı afinitelerinin yüksek olmasından yola çıkılarak bulunmuş bir radyoterapi şeklidir. Radyoterapi sırasında verilen radyasyonun, kanserli dokunun yanı sıra sağlıklı dokuya da zarar vermesi radyoterapinin önündeki en büyük engeldir. Bor, C elementine olan yakınlığından dolayı nükleik asitler, karbonhidratlar, lipidler, lipoproteinler, liposomlar, antikorlar, growth faktörler ve hormonlarla ilişki kurabilmektedir. Bor ile işaretlenmiş taşıyıcı moleküllerin tümoral bölgeye gönderilmesi ve kanserli hücrelerin elimine edilmesini hedefler. BNCT'den yola çıkılarak hipofizektomi, romatoit artritte de syneviyektomi ve Graves hastalığında tiroid dokusunu ablasyonu denenmektedir (Soloway, 1998).

2.12.3.7. Mikrobiyolojideki kullanımı

Bor minerali, bakterilerin quorum sensing moleküllerini sentezleyebilmeleri için esansiyeldir. *Vibrio harvei*'den elde edilen AI-2 furanosyl borate diester bunun en iyi örneğidir (Soloway, 1998).

Borik asit esterlerinin, mikroorganizmalara ait pek çok esansiyel enzimi inhibe ettikleri gösterilmiştir. Gram-negatiflerde bulunan, DNA methyltransferase ve gram-pozitiflerde bulunan menaquinone methyltransferase, *HIV-1* protease, *S. griseus*'a ait NAD-glycohydrolaz ve ADP-ribosyltransferaz başlıca örneklerdir (Benkovic, 2005; Pivazyan, 2000; Penyige, 1996).

β -laktam antibiyotiklere karşı direktten sorumlu β -laktamaz enzimleri de aktif bölgelerinde serin rezidüleri içerdiklerinden boronik asitlerin potansiyel hedefleridirler. Şu ana kadar *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. diversus* β -laktamazlarına karşı etkili borik asit esterleri elde edilmiştir. Borik asit esterleri sayesinde *E. coli*'ye ait TEM-1 ve AmpC β -laktamazlarının x-ray kristal yapıları çözülmüştür (Groziak, 2001).

Bir borik asit esteri olan benzadiazaborin enoyl acyl carrier protein reductaz (ENR) enzimini inhibe eder. Bu enzim NAD(P)H bağımlıdır ve yağ esidi sentezindeki son basamağı katalizler. İlginçtir ki ENR'nin moleküler hedefi triclosan ve INH ile çok benzerdir (Groziak, 2001).

Bu enzim inhibitörleri dışında doğadan elde edilmiş, bor minerali içeren, makrolid grubuna ait dört farklı antibiyotik bulunmaktadır (Soloway, 1998).

Boromycin; *Streptomyces antibioticus*'tan izole edilmiştir. Gram-negatif bakteriler ve mantarlara karşı etkili değildir aynı zamanda gram-pozitiflere ve protozoonlara etkir. HIV-1 replikasyonunu inhibe eder. *Bacillus subtilis*'in protein, DNA, RNA sentezini engeller.

Aplasmomycin; *Streptomyces. griseus*'tan izole edilmiştir. Gram-pozitif bakterilere (*B. subtilis*, *S. aureus*) ve mikobakterilere etkili bulunmuştur.

Borophycin; Mavi-yeşil bir alg olan *Nostoc linkia*'dan izole edilmiş, boron içeren bir antibakteriyeldir.

Tartrolon; *Sorangium cellulosum* suşundan elde edilmiştir. *S. aureus*'a karşı etkisi gözlenmiştir. Gram-negatif bakterilere ve mantarlara etkisizdir. Memeli hücrelerine çok toksiktir.

2.13. Apoptozis

Organizmanın normal işleyişi esnasında görülen ve düzenli olarak sürmesi gereken bir tür hücre ölüm şeklidir. Yunanca bir kelime olup, 'sonbaharda yaprakların dökülmesi' anlamını taşır. Hücrenin intiharıdır. Programlı ve fizyolojik bir ölüm şeklidir (Wang, 2008).

Yaşayan hücreler iki farklı mekanizma ile ölürler: Apoptoz ve nekroz. Apoptoz önceden programlanmış ve düzenli olarak gelişen bir ölüm şekli olmasına karşın, nekroz rastgele gelişen (genler tarafından kontrol edilmeyen) düzensiz bir süreçtir. Nekroz'da hücre dışından gelen fiziksel ve kimyasal etkilere maruz kalan hücrenin iyon dengesi bozulur ve hücre, yapısına aşırı sıvı almasıyla organelleri şişer, zar bütünlüğü kaybolur. Sonuçta hücre patlar, dağılır ve lizozomal enzimlerini kontrolsüz şekilde çevresine salar. Bu da çevre hücrelere zarar vererek, dokuda güçlü iltihabi cevaba neden olur. Apoptoz mekanizması tek bir hücre için meydana gelirken, nekroz hücre gruplarını içeren bir ölüm şeklidir (Wang, 2008).

Apoptozda hücreler su kaybederek küçülürler, büzülürler, şekilleri bozulur ve komşu hücrelerle bağlantılarını kaybederler. Sitoplazma yoğunlaşır ve organeller birbirlerine yaklaşır. Organeller genel olarak sağlamdır ve hücre membrane apoptozun geç evrelerine dek bütünlüğünü korur. En önemli değişiklikler çekirdekte izlenir. Kromatin çekirdek zarına yakın bölgede yoğunlaşır ve hilal şeklinde çekirdek zarının iç yüzeyine yerleşir. Çekirdek de büzülür, yoğunlaşır ve bazen zarla sarılı olarak bir kaç parçaya ayrılır.

Apoptoz süreci ilerledikçe, sitoplazma da çıkıntılar ve tomurcuklanmalar oluşur. Hücre daha sonra, sıkıca paketlenmiş organelleri, sitoplazma ve çekirdek parçalarını içeren 'apoptotik cisimcik' lere parçalanır. Bu parçalar komşu hücreler ve

makrofajlar tarafından fagosite edilerek dokudan uzaklaştırılır. Böylece herhangi bir doku reaksiyonunun ortaya çıkması engellenir (Wang, 2008).

2.13.1. Apoptoz mekanizmaları

Genelde apoptoza uğrayan hücreler, düzenli hücre parçalanmasına dönüşen ölüm uyarısını almışlardır. Mekanizma başladıktan ve mitokondrinin etkinleşmesinden sonra, işlem hızlı ve geri dönüşümsüz olarak sürer (Wang, 2008).

Apoptozun biyokimyasal mekanizmasını 4 aşamada incelemek mümkündür (Wang, 2008).

- 1- Ölüm sinyalleri; ölümü tetikleyen uyarılardır. Bunlar büyüme ve üreme faktörleri, hormonlar gibi yaşam sinyallerinin yokluğu, DNA hasarı ve toksik maddeler gibi apoptozu uyaran sinyaller olabilir.
- 2- Kontrol aşaması; Ölüm sinyalleri, bir kontrol adımı yardımıyla infaz programına bağlanır. Kontrol programı hem pozitif hem negatif düzenleyici molekülleri kullanır. Bu moleküller, apoptozu yok eden, uyaran veya önleyecek olan, yani hücrenin ölümü mü yoksa yaşamı mı kabul edeceğini belirleyen moleküllerdir.

Üremekte olan diğer hücrelerden alınan, devam eden yaşam uyarıları pozitif sinyallerdir. Örneğin büyüme faktörleri ve üreme faktörleri bu sinyalleri oluştururlar.

Hücre içi oksitleyici düzeyinin artması, UV ışığı, X- ışını, kemoterapötik ilaçlar gibi ajanlar tarafından DNA'ya verilen hasarlarda negatif sinyallerdir.

- 3- İnfaz fazı; Sürecin başlangıcı için kabul edilen iki ana yol vardır.

- a- Hücre içi sinyallerden kaynaklanan mekanizma: Mitokondrial mekanizma olarak da bilinir. Bu yol, genellikle hücre içi oksitleyicilerin artması, hipoksi ve DNA hasarı gibi yollarla başlatılır.
- b- Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleriyle başlatılan mekanizma.

Her iki mekanizmada da kaspazlar olarak adlandırılan ve proteinleri parçalayan enzimler faaliyete geçer.

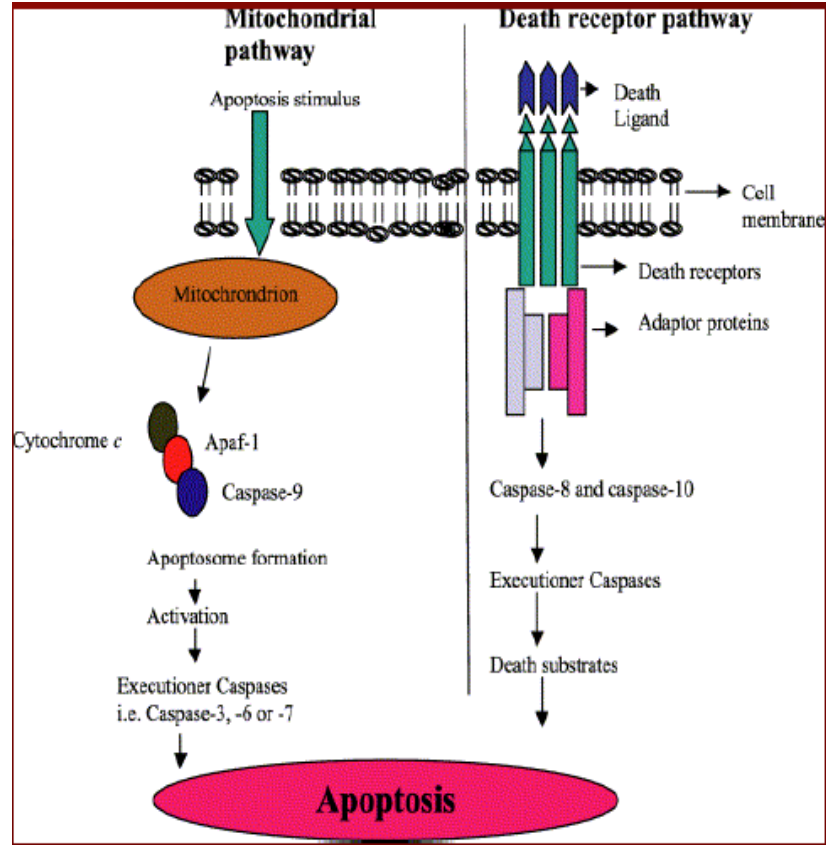
2.13.2. Kaspazlar

Kaspazlar zimojen (inaktif prokürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimdir (www.bioweb.net).

Üç sınıfa ayrılırlar;

- 1- Başlatıcı kaspazlar; Bunlar ölüm sinyallerini ikincil kaspazlara iletirler (2-8-9-10).
- 2- Efektör kaspazlar; İlgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (3-6-7).
- 3- Enflamatuar Kaspazlar: 1-4-5-11-12-13-14

Kaspazlar arasında kaspaz 9 mitokondrial yolağın, 8 ve 10 ölüm aktivatörleri mekanizmasının göstergesidir. Şekil 2.1'de apoptozisin infaz fazına ait iki farklı yolak gösterilmiştir (www.bioweb.net).



Şekil. 2.1. Apoptosis Yolakları

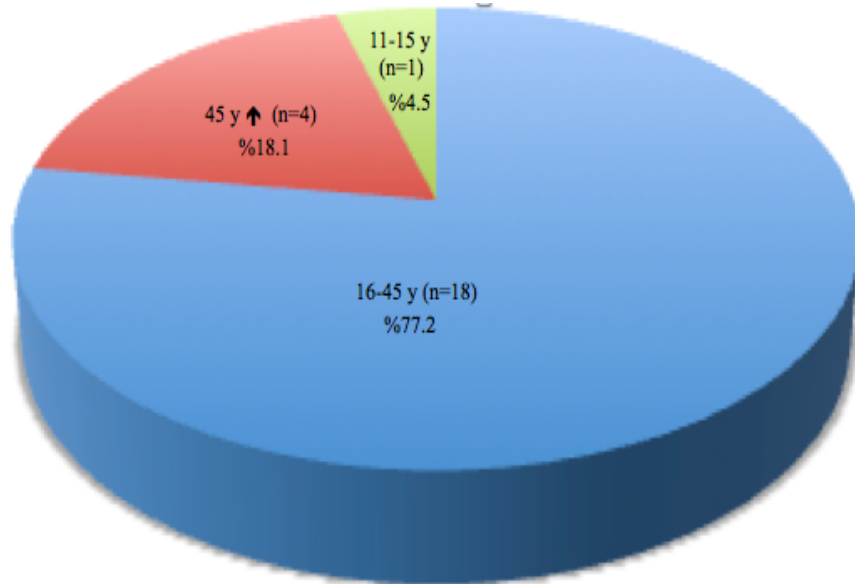
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. *Candida* Kökenleri

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji laboratuvarında, Haziran 2010- Aralık 2010 tarihleri arasında, hastaların vajinal sürüntü örneklerinden standart yöntemlerle izole edilen ve rastgele seçilen 23 *Candida* suşu ve 2 standart köken (*C. albicans* ATCC 90028, *C. crusei* ATCC 6258) olmak üzere toplam 25 *Candida* izolatu bu çalışmaya alındı.

Çalışmaya alınan vajinal sürüntü örneğinin ait olduğu hastalara, çalışmaya katılmak istediklerine dair gönüllü onam formu imzalatıldı.

Çalışmaya katılan hastaların yaş ortalaması 33.65 ± 10.45 bulundu. Bu hastalardan 1 tanesi 11-15 yaş aralığında, 18'i (Ort 31.9 ± 7.05) 16-45 yaş aralığında ve 4'ü ise (Ort 49.45 ± 2.63) 45 yaş ve üzerindeydi. Şekil 3.1'de hastaların yaşlara göre dağılımları gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Hastaların yaşlara göre dağılım oranları

Hastaların 14'ünde (%63.6) VVK lehinde en az bir bulgu mevcutken, 8'i (%36.3) asemptomatikti.

Hastaların 8'inde (%36.3) gebelik, oral kontraseptif kullanımı, altta yatan predisposan hastalık öyküsü mevcuttu.

3.2. Çalışmaya Alınan Kökenlerin Tanımlanması

Çalışmaya alınan izolatların aşağıdaki özellikleri kontrol edilerek *Candida* kökenleri olduğu doğrulandı (Murray, 2007).

1. Sabouraud dextrose agarda (Sigma-Aldrich, USA) tek koloni ekiminden 24-48 saat sonra kirli beyaz veya krem rengi, yumuşak kıvamlı ve tipik olarak mayamsı kokulu koloniler oluşturması;
2. Kültürden alınan örneklerde, direkt bakı ile 3-6 μ m büyüklüğünde, oval veya yuvarlağımsı maya hücrelerinin görülmesi
3. Germ Tüp testinde *C. albicans* maya hücrelerinin ışık mikroskopunda çimlenme borusunun görülmesi;
4. API ile kimyasal tiplendirme yapılması;
5. Mısırunu-Tween 80 agara (Oxoid, USA) ekimden 24-48 saat sonra morfolojik özelliklerinin incelenmesi

3.2.1. Germ tüp testi ile tiplendirme

Tüm maya suşlarına, identifikasyon amacı ile, standart suşlara ise ZL₃B ile muameleden sonra ilacın etki mekanizmasının açıklanması amacı ile germ tüp testi uygulanmıştır.

3.2.1.1. Gereçler

3.2.1.1.1. Besiyerleri

İnsan serumu

3.2.1.1.2. Araçlar

Lam (Triup, Çin)

Lamel (Triup, Çin)

Işık Mikroskobu (Nikon Eclipse E 200, Japonya)

Etüv (Heraus, Almanya)

3.2.1.2. Yöntem

1. 0.5 ml insan serumu içerisine test edilecek koloni inoküle edildi.
2. 37°C'de 3 saat inkübe edildi.
3. İnkübasyondan sonra lam lamel arası preparat hazırlanıp 400x büyütmede ışık mikroskobu ile incelendi.
4. Blastospordan köken alan, başlangıç noktasında hiç daralma olmayan ve uzunluğu boyunca belirgin kabarıklık olmayan filament şeklindeki yapılar germ tüp olarak değerlendirildi.
5. Germ tüp testi pozitif olan maya suşları *C. albicans* olarak tanımlandı

3.2.2. API 20C AUX sistemi ile tiplendirme

Candida olduğu tanımlanan maya mantarlarının, API 20C AUX (BioMerieux, Fransa) sistemi ile, firmanın önerileri doğrultusunda, tür düzeyinde identifikasyonları sağlandı.

3.2.2.1. Gereçler

3.2.2.1.1. Sarf malzemeleri

API 20C AUX %0.85 NaCl medium ampulü

C suspension medium ampulü

3.2.2.1.2. Araçlar

API 20 C AUX stripi ve inkübasyon kabı

McFarland eşeli

apiweb identifikasyon yazılımı

Etüv (Heraus, Almanya)

3.2.2.2. Yöntem

Uygulama aşağıdaki basamaklara uyularak, firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı (BioMerieux, Fransa).

1. Stripin hazırlanması: İnkübasyon kabının içindeki kuyucuklar, 5 ml distile su ile dolduruldu, strip paketi açılarak içine yerleştirildi.
2. İnokülasyon: SDA'daki 24 saatlik *Candida* kolonileri steril bir öze ile alınıp, 2ml'lik Suspension Medium (%0.85 NaCl) içine inoküle edildi. Yoğunlukları

2 McFarland'a göre ayarlandı. Bu süspansiyondan, kit içeriğinde olan C medium içine 100 mikrolitre aktarıldı. Yeni karışımdan strip içindeki kuyucuklara, kuyucukları dolduracak şekilde dağıtıldı. Strip inkübasyon kabının içine yerleştirilip, kapağı kapatıldı. 30°C'de 24-72 saat inkübe edildi.

3. Stripin okunması: Bulanıklık olan kuyucuklarda üreme pozitif kabul edildi. Testin geçerliliği için negatif kontrolde üremenin olmamasına dikkat edildi. Özellikle glukoz kuyucuğunda üreme olmamışsa inkübasyon süresi 24 saatten 72 saate kadar uzatıldı. Üreme olan kuyucuklar not edildi. Mayaların karbonhidrat asimilasyon yetenekleri 24. 48. ve 72. saatte değerlendirildi.
4. İdentifikasyon: Test prosedürüne göre üreme olan kuyucuklara değerlendirme cetvelinde 1,2,4 şeklinde numaralar verildi. Her bir grup içindeki sayılar toplandı ve elde edilen sayısal profil, API 20C AUX Analytical Profile Index'e göre değerlendirildi.

3.3. Mısır Unlu Tween 80 Agar İle Tiplendirme

Tüm maya suşlarına, identifikasyon amacı ile ve buna ek olarak, standart suşlara ZL₃B ile muameleden sonra, germ tüp ve hifa oluşumu üzerine ilacın etkisinin açıklanması amacı ile Mısır unlu tween 80 agara ekim yapılmıştır.

3.3.1. Gereçler

3.3.1.1. Besiyerleri

Mısır unlu tween 80 agar

Mısır Unlu Tween 80 Agar

Hazırlanması:

Mısır unu 40.0 g

Agar 15.0 g

Tween 80 100 ml

dH₂O 1000 ml

1. Mısır unu 450 ml. distile su içerisinde konulup kaynatıldı ve süzöldü.
2. İçerisine 15 gr. agar eritilip eklendi
3. Karışım 100 ml. Tween 80 eklendi
4. 121°C'de 15 dk. sterilize edildi.
5. Besiyeri soğuyunca plaklara dağıtıldı.

3.3.1.2. Kimyasal madde ve malzemeler

Agar (HiMedia Lab Ltd, Hindistan)

Tween 80 (Merck, Almanya)

3.3.1.3. Araçlar

Işık Mikroskopu (Nikon Eclipse E 200, Japonya)

Etüv (Heraus, Almanya)

3.3.2. Yöntem

1. Test edilecek koloniden eküvyon ile bir parça alınıp besiyeri üzerine birbirine paralel çizgiler halinde ekim yapıldı.
2. Ekim alanının üzeri steril bir lamelle kapatıldı.
3. 35°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra ışık mikroskopunda 400x büyütmede mikroskopik morfolojik özellikler incelendi.

4. Hif ve pseudohif yapma özellikleri belirlendi. Yalancı hiflerin boğumları çevresinde kümeler oluşturmuş yuvarlak blastokonidyumlar ile hif uçlarında türe özgü kalın duvarlı, tek veya birkaç klamidospore görülmesi *C.albicans* olarak değerlendirildi.

3.4. Mikrodilüsyon Yöntemi İle Antifungal Duyarlılık Testi

Mikrodilüsyon ile antifungal MİK belirlenmesi CLSI M27-A3 standartlarına göre yapıldı. Kontrol suşu olarak *C. albicans* ATCC 90028 ve *C. crusei* ATCC 6258 suşları kullanıldı.

3.4.1. Gereçler

3.4.1.1. Antifungaller

Flukonazol (İbrahim Ethem İlaç A.Ş, İstanbul, Türkiye)

Amfoterisin B (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)

3.4.1.2. Kimyasal madde ve malzemeler

RPMI 1640, bikarbonatsız, L-glutaminli, pH indikatörlü (Sigma Chemical Co, USA)

MOPS (3-N-morpholino propanesulfonic acid) (Sigma Chemical Co, USA)

NaOH (Sigma Chemical Co, USA)

DMSO (Sigma Chemical Co, USA)

3.4.1.3. Araçlar

pHmetre (WTW Inolab, USA)

Manyetik karıştırıcı (WTW Inolab,USA)

Hassas Terazı (WTW Inolab, USA)

Ependorf tüpleri 1.5 ml (GREINER BIO-ONE, Almanya) Otomatik Pipet (GREINER BIO-ONE, Almanya)

96 kuyucuklu U dipli mikroplak (SantaCruz Biotechnology Inc, USA)

0.22µm'lik filtre (GREINER BIO-ONE, Almanya)

50 ml'lik enjektör (GREINER BIO-ONE, Almanya)

15 ml'lik falcon tüp (GREINER BIO-ONE, Almanya)

50 ml'lik falcon tüp (GREINER BIO-ONE, Almanya)

Neubauer Lamı (SantaCruz Biotechnology Inc, USA)

Etüv (Heraus, Almanya)

3.4.1.4. MİK tayininde kullanılan solüsyonlar

RPMI 1640 Besiyeri, pH 6.9-7.1

Hazırlanması

RPMI 1640, bikarbonatsız, L-glutaminli, pH indikatörlü 10,4g

0.165 M MOPS 34.53g

Distile su 1000 ml

1mol/L NaOH

Hazırlanması

Steril distile su	100ml
NaOH	4 g

Bu şekilde hazırlanan stok solüyonları aşağıdaki şekilde kullanılır:

1. Silindirik mezür içine 900 ml distile su konulur,
2. 34.53 g MOPS eklenir,
3. 10.4 g RPMI eklenip, manyetik karıştırıcıda karıştırılır,
4. 1mol/L NaOH'den pH 6.9-7.1'e ulaıncaya kadar eklenip, eklenen NaOH miktarı not edilir,
5. Toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanır.

3.4.1.5. Antifungal stok solüyonları

Hazırlanması

Antifungal ilaç miktarları:

Ağırlık (mg) = [Hacim(ml)xKonsantrasyon(µg/ml)] / Potens (µg /ml) formülüne göre hesaplanan antifungaller aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Amfoterisin B:

Potens: %80 (100ml'de 80 mg, 1 ml'da 800µg; yani potensi 800 µg/ml)

Stok solüyonun konsantrasyonu: 1600 µg/ml

Hacim: 20 ml DMSO

$$\text{Ağırlık} = (20 \times 1600) / 800 = 40 \text{mg} = 0.040 \text{g}$$

Flukonazol:

Potens:%100 (100ml'de 100mg, 1ml'de 1000µg; yani potensi 1000 µg/ml) Stok solüsyonun konsantrasyonu:1280 µg/ml

Hacim: 20 ml distile su

$$\text{Ağırlık} = (20 \times 1280) / 1000 = 25.6 \text{ mg} = 0.0256 \text{g}$$

1. Amfoterisin B DMSO içinde, flukonazol distile su içinde çözdürüldü.
2. Her bir stok solüsyon, birer ml olacak şekilde 20 adet steril tüpe aktarıldı ve -70°C'de saklandı.
3. Hazırlanıp -70°C'de saklanan antifungal stok solüsyonlar, dilüsyonlar hazırlanırken yeterli miktarda eriditildi. Her bir antifungal ilaç için ayrı ayrı seri dilüsyonlar hazırlandı ve tüpler isimlendirildi.
4. Amfoterisin B ilk dilüsyon 1/50, sonraki dilüsyonlar 1/2 oranında RPMI besiyeri ile hazırlandı. 32 - 0.06 µg/ml konsantrasyon aralığında 10 farklı dilüsyon elde edildi.
5. Flukonazol için ilk dilüsyon 1/10, sonraki dilüsyonlar 1/2 oranında RPMI besiyeri ile yapıldı. 128 - 0.250 µg/ml konsantrasyon aralığında 10 farklı dilüsyon elde edildi.

Bu konsantrasyonlar inokulum ile ½ tekrar dilüe olacağı için mikrolaktaki son konsantrasyonları yarıya inecektir (Amfoterisin B 16 - 0.03 µg/ml, Flukonazol: 64-0.125 µg/ml).

6. Mikroplağın yatay sıradaki son kuyucuğu (12. kuyucuk) sterilite kontrol kuyucuğu olarak belirlendi ve 100 µl RPMI kondu.
7. Mikroplağın 11. kuyucuğu üreme kontrol kuyucuğu olarak belirlendi ve 50 µl

RPMI kondu. Üzerine 50 µl inokulum eklendi.

8. En düşük ilaç konsantrasyonu 10. kuyucukta, en yüksek ilaç konsantrasyonu 1. kuyucukta olacak şekilde 50'şer µl dilüsyonlar otomatik pipetle dağıtıldı.
9. Eğer inokulumlar bu aşamada eklenmeyecekse mikroplaklar -20°C'de saklanmak üzere kaldırıldı ve çalışma öncesinde oda sıcaklığında bir süre bekletildi.

3.4.1.6. İnokulum solüsyonları

Hazırlanması

1. Her bir suş için üç adet tüp dizildi (A, B, C tüpleri).
2. A tüpüne 2 ml Serum fizyolojik
- B tüpüne 4.75 ml RPMI besiyeri
- C tüpüne 4.9 ml RPMI besiyeri kondu.
3. A tüpünde, SDA'da bir gece inkübe edilmiş olan *candida* suşları Neubauer Lamı ile sayılarak $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ CFU/ml maya içeren inokulumlar hazırlandı
4. A tüpündeki süspansiyondan 0.25 ml alınarak B tüpüne eklendi (toplam hacim 5 ml, sulandırım 1/20).
5. B tüpündeki süspansiyondan 0.1 ml alınarak C tüpüne eklendi (toplam hacim 5 ml, sulandırım 1/50).
6. B tüpündeki süspansiyon mikroplaklara eklendi ve plaklardaki maya miktarı ise $0.5 \times 10^3 - 2.5 \times 10^3$ CFU/ml oldu.
7. Mikroplaklarda 12. kuyucuklar hariç tüm kuyucuklara 50 µl inokulum eklendi.

8. Amfoterisin B içeren mikropaklar alüminyum folyoya sarıldıktan, diğerlerinin de etüvde buharlaşmalarını engellemek amacıyla uygun önlemler (naylon torbaya koymak gibi) alındıktan sonra sıcaklığı 35°C olan etüve kaldırıldı ve 48. saatte sonuçlar değerlendirildi.
9. Sonuçlar değerlendirilmeden önce mikropaklar karıştırıcıda karıştırıldı ve kuyucuklardaki bulanıklıklar homojen hale gelince üreme kontrol kuyucuğundaki bulanıklıkla karşılaştırılarak ayna yardımıyla değerlendirildi.

Amfoterisin B için hiç üremenin olmadığı berrak kuyucuk, Flukonazol için üreme kontrol kuyucuğuna göre bulanıklığın %80 azaldığı kuyucuk MİK değeri olarak belirlendi.

3.5. Mikrodilüsyon Yöntemi İle ZL₃B'nin Antifungal Duyarlılığının Belirlenmesi

ZL₃ B'nin *Candida* kökenleri üzerindeki etkinliği, mikrodilüsyon yöntemi ile NCCLS M27-A3 standartlarına göre yapıldı. Kontrol suşu olarak *Candida albicans* ATCC 90028 ve *C. crusie* ATCC 6258 suşları kullanıldı. Sonuçlar Flukonazol ve Amfoterisin B ile karşılaştırıldı.

3.5.1. Gereçler

3.5.1.1. Antifungaller

Flukonazol (İbrahim Ethem İlaç A.Ş, Türkiye) Amfoterisin B (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) ZL₃B (Boston Biochem Inc, USA)

3.5.1.2. Kimyasal madde ve malzemeler

RPMI 1640, bikarbonatsız, L-glutaminli, pH indikatörlü (Sigma Chemical Co, USA)

MOPS (3-N-morpholino propanesulfonic acid) (Sigma Chemical Co, USA) NaOH (Sigma Chemical Co, USA)

DMSO (Sigma Chemical Co, USA)

3.5.1.3. Araçlar

pH metre (WTW Inolab, Amerika)

Manyetik karıştırıcı (WTW Inolab,USA)

Hassas Terazı (WTW Inolab, USA)

Ependorf tüpleri 1.5 ml (GREINER BIO-ONE, Almanya) Otomatik Pipet (GREINER BIO-ONE, Almanya)

96 kuyucuklu U dipli mikroplak (SantaCruz Biotechnology Inc, USA)

0.22µm'lik filtre (GREINER BIO-ONE, Almanya)

50 ml' lik enjektör (GREINER BIO-ONE, Almanya)

15 ml'lik falcon tüp (GREINER BIO-ONE, Almanya)

50 ml'lik falcon tüp (GREINER BIO-ONE, Almanya)

Neubauer Lamı (SantaCruz Biotechnology Inc, USA)

Etüv (Heraus, Almanya)

3.5.1.4. MİK tayininde kullanılan solüsyonlar

RPMI 1640 Besiyeri, pH 6.9-7.1

Hazırlanması

RPMI 1640, bikarbonatsız, L-glutaminli, pH indikatörlü	10,4g
0.165 M MOPS	34.53g
Distile su	1000 ml

1mol/L NaOH

Hazırlanması

Steril distile su	100ml
NaOH	4 g

Bu şekilde hazırlanan stok solüyonları aşağıdaki şekilde kullanılır:

1. Silindirik mezür içine 900 ml distile su konulur,
2. 34.53 g MOPS eklenir,
3. 10.4 g RPMI eklenip, manyetik karıştırıcıda karıştırılır,
4. 1mol/L NaOH'den pH 6.9-7.1'e ulaşmaya kadar eklenip, eklenen NaOH miktarı not edilir,
5. Toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanır.

3.5.1.5. Antifungal stok solüsyonları

Hazırlanması

Antifungal ilaç miktarları:

Ağırlık (mg) = [Hacim(ml) x Konsantrasyon(µg/ml)] / Potens (µg /mg) formülüne göre hesaplanan antifungaller aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Amfoterisin B:

Potens: %80 (100ml'de 80 mg, 1 ml'de 800µg; yani potensi 800 µg/ml) Stok solüsyonun konsantrasyonu: 1600 µg/ml

Hacim: 20 ml DMSO

Ağırlık = (20x1600)/800 = 40mg = 0.040g

Flukonazol:

Potens: %100 (100ml'de 100mg, 1ml'de 1000µg; yani potensi 1000 µg/ml)

Stok solüsyonun konsantrasyonu: 1280 µg/ml

Hacim: 20 ml distile su

Ağırlık = (20x1280)/1000 = 25.6 mg = 0.0256g

ZL₃B

Potens: %100 (100ml'de 100mg, 1ml'de 1000µg; yani potensi 1000µg/ml) Stok solüsyonun konsantrasyonu: 100 µg/ml

Hacim: 1ml DMSO Konsantrasyon = 200 µM

1. Amfoterisin B ve ZL₃B DMSO içinde, flukonazol distile su içinde çözdürüldü.
2. Her bir stok solüsyon, birer ml olacak şekilde 20 adet steril tüpe aktarıldı ve

- 70°C'de saklandı.

3. Hazırlanıp -70°C'de saklanan antifungal stok solüsyonlar, dilüsyonlar hazırlanırken yeterli miktarda eritildi. Her bir antifungal ilaç için ayrı ayrı seri dilüsyonlar hazırlandı ve tüpler isimlendirildi.
4. Amfoterisin B ilk dilüsyon 1/50, sonraki dilüsyonlar 1/2 oranında RPMI besiyeri ile hazırlandı. 32 - 0.06 µg/ml konsantrasyon aralığında 10 farklı dilüsyon elde edildi.
5. Flukonazol için ilk dilüsyon 1/10, sonraki dilüsyonlar 1/2 oranında RPMI besiyeri ile yapıldı. 128 - 0.250 µg/ml konsantrasyon aralığında 10 farklı dilüsyon elde edildi.

Bu konsantrasyonlar inokulum ile ½ tekrar dilüe olacağı için mikrolaktaki son konsantrasyonları yarıya inecektir. (Amfoterisin B 16-0.03 µg/ml, Flukonazol: 64 - 0.125 µg/ml)

6. ZL₃B, üretici firma tarafından, 100 µg'lık ambalajlarda sunulduğu için, 1ml DMSO ile sulandırılıp ½ dilüsyonları hazırlanarak kullanıldı. Bu şekilde yapılan sulandırım ile ZL₃B, konsantrasyonu ilk kuyucukta 100 µg/ml, son kuyucukta 0,195 µg/ml olarak hesaplandı.
7. Mikroplağın yatay sıradaki son kuyucuğu (12. kuyucuk) sterilite kontrol kuyucuğu olarak belirlendi ve 100 µl RPMI kondu.
8. Mikroplağın 11. kuyucuğu üreme kontrol kuyucuğu olarak belirlendi ve 50 µl RPMI kondu. Üzerine 50 µl inokulum eklendi.
9. En düşük ilaç konsantrasyonu 10. kuyucukta, en yüksek ilaç konsantrasyonu 1. kuyucukta olacak şekilde 50'şer µl dilüsyonlar otomatik pipetle dağıtıldı.
10. Eğer inokulumlar bu aşamada eklenmeyecekse mikrolaklar -20°C'de saklanmak üzere kaldırıldı ve çalışma öncesinde oda sıcaklığında bir süre bekletildi.

3.5.1.6. İnokulum solüsyonları

Hazırlanması

1. Her bir suş için üç adet tüp dizildi (A, B, C tüpleri).
2. A tüpüne 2 ml Serum fizyolojik
B tüpüne 4.75 ml RPMI besiyeri
C tüpüne 4.9 ml RPMI besiyeri kondu.
3. A tüpünde, SDA'da bir gece inkübe edilmiş olan *candida* suşları Neubauer Lamı ile sayılarak 1×10^6 - 5×10^6 CFU/ml maya içeren inokulumlar hazırlandı
4. A tüpündeki süspansiyondan 0.25 ml alınarak B tüpüne eklendi (toplam hacim 5 ml, sulandırım 1/20).
5. B tüpündeki süspansiyondan 0.1 ml alınarak C tüpüne eklendi (toplam hacim 5 ml, sulandırım 1/50).
6. B tüpündeki süspansiyon mikroplaklara eklendi ve plaklardaki maya miktarı ise 0.5×10^3 - 2.5×10^3 CFU/ml oldu.
7. Mikroplaklarda 12. kuyucuklar hariç tüm kuyucuklara 50 µl inokulum eklendi.
8. Amfoterisin B içeren mikroplaklar alüminyum folyoya sarıldıktan, diğerlerinin de etüvde buharlaşmalarını engellemek amacıyla uygun önlemler (naylon torbaya koymak gibi) alındıktan sonra sıcaklığı 35°C olan etüve kaldırıldı ve 48. saatte sonuçlar değerlendirildi.
9. Sonuçlar değerlendirilmeden önce mikroplaklar karıştırıcıda karıştırıldı ve kuyucuklardaki bulanıklıklar homojen hale gelince üreme kontrol kuyucuğundaki bulanıklıkla karşılaştırılarak ayna yardımıyla değerlendirildi.

Amfoterisin B ve ZL₃B için hiç üremenin olmadığı berrak kuyucuk, Flukonazol ve için üreme kontrol kuyucuğuna göre bulanıklığın %80 azaldığı kuyucuk MİK değeri olarak belirlendi.

3.6. Oksidatif Metabolizma Tayini

Alamar blue test kiti ile, üretici firmanın önerileri doğrultusunda, ZL₃B ile muamele edilmiş olan standart suşların, ilaç uygulamasından sonra oksidatif metabolizmasında meydana gelen değişiklikler incelendi.

3.6.1. Gereçler

3.6.1.1. Kimyasal madde ve malzemeler

ZL₃B (Boston Biochem Inc, USA)

Alamar blue boyası (Invitrogen, USA)

RPMI 1640 bikarbonatsız, L-glutaminli, pH indikatörlü (Sigma Chemical Co, USA)

MOPS (3-N-morpholino propanesulfonic acid) (Sigma Chemical Co, USA) NaOH (Sigma Chemical Co, USA)

DMSO (Sigma Chemical Co, USA)

3.6.1.2. Sarf malzemeleri

96 kuyucuklu düz dipli mikroplate (Orange Scientific, USA)

3.6.1.3. Araçlar

Spektrofotometre (Thermolabsystems Multiskan Ex, USA)

Etüv (Heraeus, Almanya)

ZL₃B

Hazırlanması

Potens: %100 (100ml'de 100mg, 1m'de 1000µg; yani potensi 1000µg/ml)

Stok solüsyonun konsantrasyonu: 100 µg/ml

Hacim: 1ml DMSO Konsantrasyon = 200 µM

1. ZL₃B DMSO içinde çözdürüldü.
2. ZL₃B, üretici firma tarafından, 100 µg'lık ambalajlarda sunulduğu için, tartım hatasının önüne geçmek üzere molarite hesabına göre sulandırıldı. 1ml DMSO ile sulandırılıp ½ dilüsyonları hazırlanarak kullanıldı.

RPMI 1640 Besiyeri, pH 6.9-7.1

Hazırlanması

RPMI 1640, bikarbonatsız, L-glutaminli, pH indikatörlü	10,4g
0.165 M MOPS	34.53g
Distile su	1000 ml

1mol/L NaOH

Hazırlanması

Steril distile su	100ml
NaOH	4 g

Bu şekilde hazırlanan stok solüyonları aşağıdaki şekilde kullanılır:

1. Silindirik mezür içine 900 ml distile su konulur,
2. 34.53 g MOPS eklenir,
3. 10.4 g RPMI eklenip, manyetik karıştırıcıda karıştırılır,
4. 1mol/L NaOH'den pH 6.9-7.1'e ulaıncaya kadar eklenip, eklenen NaOH miktarı not edilir,
5. Toplam hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanır.

3.6.2. Yöntem

1. 96 kuyucuklu düz dipli kuyucuklara 100 µg, 50 µg, 25 µg konsantrasyonlarda 45 µl ZL₃B konuldu.
2. 45 µl mikroorganizma süspansiyonu, 1x10³ CFU/ ml konsantrasyonda olacak şekilde bu kuyucuklara eklendi.
3. 10 µl *Alamar blue* boyası eklendikten sonra, mikroplaklar 24 saat 37°C' de inkübe edildi.
4. Negatif kontrol kuyucuğuna sadece ZL₃B, pozitif kontrol kuyucuğuna ise sadece maya hücreleri konuldu.
5. 24 saat sonunda mikroplaklarda meydana gelen renk değişimi, 570 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü.

3.7. Biyofilm Deneyleri

Standart suşlar üzerinde; 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml konsantrasyonlardaki ZL₃B'nin biyofilm oluşturma potansiyeli üzerine olan etkisi mikroplak yöntemi ile araştırıldı.

3.7.1. Gereçler

3.7.1.1. Besiyerleri

Sabouraud Dekstroz Broth (SDB)

Hazırlanması

Glukoz 40 g

Neopepton 10 g

Agar 20 g

dH₂O 1000 ml

1. Glikoz, neopepton, agar karışımı distile su içinde çözüldü.
2. pH 7.2-7.5 olarak ayarlandı.
3. 105°C'de 15 dk. steril edildi.

3.7.1.2. Kimyasal madde ve malzemeler

Fosfat buffer salin – PBS (İnvitrogen, USA)

ZL₃B (Boston Biochem Inc, USA)

Kristal viyole (Merck, Almanya)

Etanol (Merck, Almanya)

Glukoz (Merck, Almanya)

Neopepton (Merck, Almanya)

Agar (HiMedia Lab Ltd, Hindistan)

3.7.1.3. Araçlar

Spektrofotometre (Boston Biochem Inc, USA)

Etüv (Heraus, Almanya)

Çalkalamalı İnkübatör (HVD, Avusturya)

3.7.1.4. Yöntem

1. 1×10^6 hücre / ml, 100 µl PBS içerisinde dilüe edilip 96 kuyucuklu mikroplaklara ekildi.
2. 1.5 saat 37°C 'de 75 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi.
3. Bu sürenin sonunda 150 µl PBS ile iki kez yıkandı.
4. Yıkanan kuyucuklara, DMSO içinde çözülmüş 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml konsantrasyonlarda ZL3B'den 50 µl eklendi. Kuyucuklardaki ZL3B, SDB ile 100 µl'ye tamamlandı.
5. 48 saat 37°C 'lik etüvde inkübe edildi.
6. 48 saat sonunda, 200 µl PBS ile iki kez yıkandı.
7. 45 dk. kurutuldu.
8. 110 µl %0.4 kristal viyole ile 45 dk. boyandı.
9. 350 µl steril distile su ile 4 kez yıkandı.
10. 200 µl %95 ethanol ile 45 dk. reksizleştirme işlemi yapıldı.
11. Solüsyonlar temiz kuyucuklara aktarılıp, 595nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüm yapıldı.
12. Negatif kontrol kuyucuğuna sadece ZL3B, pozitif kontrol kuyucuğuna ise sadece maya hücreleri konuldu.

3.8. Apoptoz Deneyi

Standart suşlar üzerinde; 200 µg/ml 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml konsantrasyonlarda ZL3B'nin, apoptoz oluşturma etkisi moleküler yöntemlerle incelendi. Bu amaçla, DNA ekstraksiyonu firmanın (Invisorb, Germany) önerileri doğrultusunda yapıldıktan sonra, ekstrakte edilen DNA'da meydana gelen kromozom kırıkları jel elektroforezi ile görüntülendi.

3.8.1. Gereçler

3.8.1.1. Besiyerleri

Sabouraud Dekstroz Broth (SDB)

Hazırlanması

Glukoz 40 g

Neopepton 10 g

Agar 20 g

dH₂O 1000 ml

1. Glukoz, neopepton, agar karışımı distile su içinde çözüldü.
2. pH 7.2-7.5 olarak ayarlandı.
3. 105°C'de 15 dk. steril edildi.

3.8.1.2. Kimyasal madde ve malzemeler

Glukoz (Merck, Almanya)

Neopepton (Merck, Almanya)

Agar (HiMedia Lab Ltd, Hindistan)

DNA ekstraksiyon kiti (Invisorb, Germany)

Agaroz (Prona, European Ecoomic Commuty)

Tris Buffer EDTA- TBE (Biological Industries, USA)

Etidyum Bromür (Applichem, USA)

3.8.1.3. Araçlar

Mikrodalga fırın (Beko MD 1500, Türkiye)

Elektroforez cihazı (Thermo Electron Corporation 4000P, Türkiye)

Vorteks (HVD, Avusturya)

UV Translüminatör (Viber-Lourmat TFX-20M, Fransa)

Kuru Isıtıcı Blok Vorteks (HVD, Avusturya)

Santrifüj (Hermle Z233 MK-2, Almanya)

Etüv (Heraus, Almanya)

3.8.1.4. Jel elektroforez işleminde kullanılan solüsyonlar

Agaroz Jel (%1)

Hazırlanışı

Agar.....	2,5 mg
TBE X 0.5.....	25 ml
Etidyum Bromür.....	3 µl

1. Agar tartıldı.
2. TBE içerisinde mikrodalga fırında çözüldü.
3. Karışım soğuyunca etidyum bromür eklendi ve çalkalandı.
4. Elektroforez tankına ait tabağa jel döküldü.
5. Jel donunca tabak tanka yerleştirildi.
6. Güç kaynağı 100mv'a ayarlanıp, DNA'lar 15 dakika yürütüldü.

TBE X 0,5 Tamponu

Hazırlanışı:

TBE X 5.....	20 ml
dd H ₂ O.....	980 ml

1. TBE X 5'den 20 ml otomatik pipetör ile alınıp, 980 ml dd H₂O ile karıştırıldı.

3.8.2. Yöntem

1. 1×10^3 hücre / ml *Candida* hücresi, SDB ile dilue edilmiş 200 µg/ml 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml konsantrasyonlarda ZL₃B solüsyonu ile 37°C'de 3 saat inkübe edildi.
2. 3 saat sonunda reaksiyonu sonlandırmak için 100 µl'lik solüsyonlar 1.5 ml ependorf tüplerine aktarılıp, 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra PBS ile 3 kez yıkandı.
3. Kuru ısıtıcı blok 52 °C'ye ayarlanıp, Elution Buffer D ısınmaya bırakıldı.
4. 400 µl Lysis Buffer G ve 50 µl lyticase enzimi, reaksiyonun durdurulduğu ependorflara eklenip, solüsyonlar vortekslendi.
5. Reaksiyon tüpleri sıcak su banyosunda 35°C'de 1 saat bekletildi.
6. 1 saat sonunda 11000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant başka bir ependorfa aktarıldı.
7. 200 µl Binding Buffer T eklenip 10 saniye vortekslendi.
8. Spin filtreli tüplere aktarılıp, 1 dakika beklendi. 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
9. Ependorfun dip kısmındaki sıvı boşaltılıp, filter tekrar takıldı. 550 µl Wash Buffer eklendi. 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı.
10. Filtre bir kez de boş şekilde santrifüj edildikten sonra kalan son etanolde uzaklaştırıldı.
11. Filtre boş ependorfa aktarılıp, 200 µl Elution Buffer D eklendi. 3 dakika oda ısısında bekletilip, 8000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
12. Filtre atılıp, %1 'lik agaroz jelde, 100 voltta 15 dakika süresince yürütülen DNA, UV translüminatörde görüntülendi.

3.9. İstatistik İnceleme

Tüm deneyler üç kez tekrar edildi. Elde edilen sonuçlar üç yönlü varyans analizi ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. *Candida* Kökenleri

Çalışmaya alınan 23 kökenin 11'i (%45.4) *C. albicans*, 8'i (%36.3) *C. glabrata*, 4'ü (%18,1) diğer *non- albicans Candida* türleri olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.1. İzole edilen *Candida* türleri

	Sayı	Toplam (%)
<i>C. albicans</i>	11	45.5
<i>C. glabrata</i>	8	36.3
Diğer	4	18.1

4.2. *Candida* Kökenlerinin Flukonazol ve Amfoterisin B ile Yapılan Antifungal Duyarlılık Testleri

Çalışmaya alınan suşların MİK değerleri amfoterin B için CLSI M27 A-3 kriterlerine göre $\geq 1\mu\text{g/ml}$ ise dirençli kabul edilmiştir (CLSI, 2011).

Flukonazol için ise, CLSI farklı kökenler için farklı direnç değerleri önermektedir. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* için $\geq 4\mu\text{g/ml}$, *C. glabrata* için $\geq 32\mu\text{g/ml}$ ise dirençli kabul edilir (CLSI, 2011).

Hastalardan izole edilen *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve standart kökenlerden *C. albicans* ATCC 90028'in tümü flukonazol ve amfoterisin B'ye duyarlı iken (%95.4); hastalardan izole edilen 1 (%4.5) *C. glabrata* kökeni ve standart *C. crusei* kökeni fluconazole dirençli bulundu. Tablo 4.2.'de izole edilen *Candida* kökenlerinin antifungal duyarlılık durumları görülmektedir.

Tablo 4.2. *Candida* kökenlerinin duyarlılık durumları

Hasta Kökenleri	MİK ARALIĞI	MİK 50	MİK ARALIĞI	MİK 50 (µg/ml)
	Flukonazol	Flukonazol	Amfoterisin B	Amfoterisin B
	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
<i>C. albicans</i>	4	1	1	0.5
<i>C. albicans</i>	4	2	1	0.25
<i>C. albicans</i>	4	0.5	1	0.25
<i>C. albicans</i>	4	0.5	1	0.5
<i>C. albicans</i>	4	2	1	0.25
<i>C. albicans</i>	4	1	1	0.5
<i>C. albicans</i>	4	0.25	1	0.5
<i>C. albicans</i>	4	0.5	1	0.25
<i>C. albicans</i>	4	1	1	0.5
<i>C. albicans</i>	4	1	1	0.5
<i>C. glabrata</i>	32	8	1	0.25
<i>C. glabrata</i>	32	8	1	0.25
<i>C. glabrata</i>	32	32	1	0.5
<i>C. glabrata</i>	32	8	1	0.25
<i>C. glabrata</i>	32	0.5	1	0.5
<i>C. glabrata</i>	32	8	1	0.5
<i>C. glabrata</i>	32	8	1	0.25
<i>C. glabrata</i>	32	16	1	0.5
<i>C. tropicalis</i>	4	0.5	1	0.5
<i>C. tropicalis</i>	4	0.25	1	0.25
<i>C. parapsilosis</i>	4	0.25	1	0.25
<i>C. parapsilosis</i>	4	0.5	1	0.5
<i>C. albicans</i>	4	1	1	0.5
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	4	1	1	0.5
<i>C. crusei</i> ATCC 6258	Doğal Direnç	32	1	0.5

4.3. *Candida* Kökenlerinin ZL₃B İle Yapılan Antifungal Duyarlılık Testleri

Rasgele seçilen 23 hasta kökeni ve 2 standart suş ile yapılan, CLSI'nin M27-A3 kriterlerine göre uygulanan, antifungal duyarlılık testlerine göre ZL₃B etken maddesinin MİK₅₀ değeri 25-50µg/ml konsantrasyon aralığında, MFK (Minimum

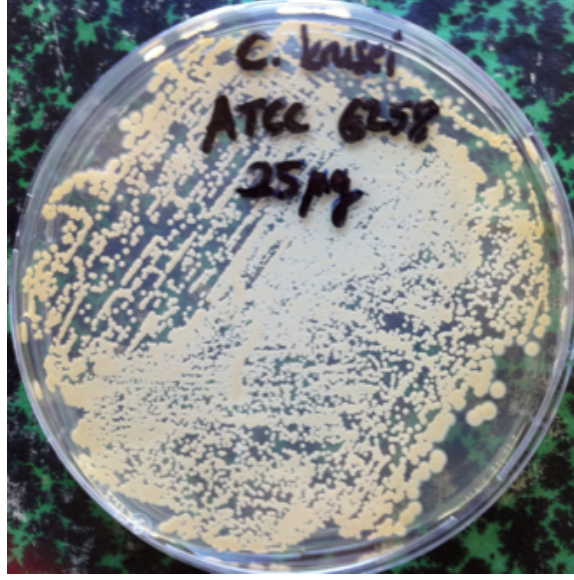
fungusidal konsantrasyon) değeri ise 50-100 µg/ml konsantrasyon aralığındadır. İzole edilen 22 köken ve 2 standart suşun tamamında, 50 µg/ml konsantrasyon maya hücrelerinin tamamını inhibe ederken; fluconazole dirençli olan *C. glabrata* kökeni ancak 100µg/ml konsantrasyonda inhibe edilebilmiştir. Tablo 4.3’de izole edilen *Candida* kökenlerinin ZL₃B etken maddesine karşı duyarlılık durumları görülmektedir.

Tablo 4.3. *Candida* kökenlerinin ZL₃B duyarlılık durumları

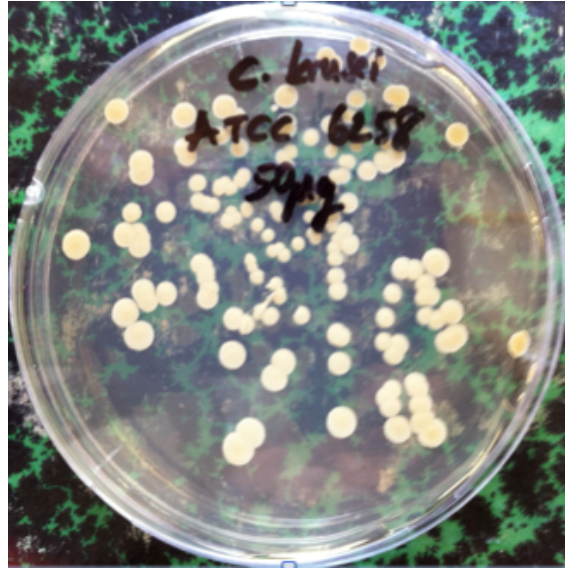
Hasta Kökenleri	MİK - ZL ₃ B (µg/ml)	MFK - ZL ₃ B (µg/ml)
<i>C. albicans</i>	1	0.5
<i>C. albicans</i>	1	0.25
<i>C. albicans</i>	1	0.25
<i>C. albicans</i>	25	50
<i>C. albicans</i>	25	50
<i>C. albicans</i>	50	50
<i>C. albicans</i>	50	50
<i>C. albicans</i>	50	50
<i>C. albicans</i>	50	50
<i>C. albicans</i>	25	50
<i>C. glabrata</i>	50	50
<i>C. glabrata</i>	50	50
<i>C. glabrata</i>	50	100
<i>C. glabrata</i>	50	50
<i>C. glabrata</i>	50	50
<i>C. glabrata</i>	50	50
<i>C. glabrata</i>	50	50
<i>C. glabrata</i>	50	50
<i>C. tropicalis</i>	25	50
<i>C. tropicalis</i>	25	50
<i>C. parapsilosis</i>	25	50
<i>C. parapsilosis</i>	25	50
<i>C. albicans</i>	25	50
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	25	50
<i>C. crusei</i> ATCC 6258	50	50

Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3’de 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml konsantrasyonlarda ZL₃B ile

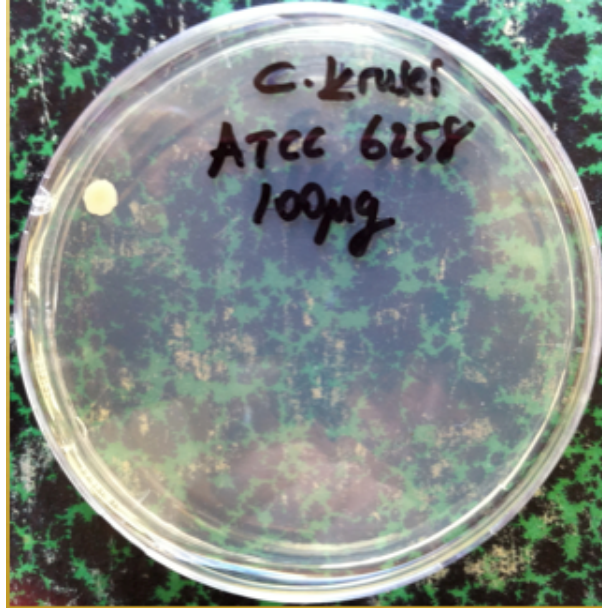
karşılaşmış, 0.5×10^3 - 2.5×10^3 CFU/ml konsantrasyonunda *C. krusei* ATCC 6258 maya hücrelerinin, 24 saatlik inkübasyonundan sonra, SDA plaklarında meydana gelen üremelerine ait fotoğraflar görülmektedir.



Şekil 4.1. 25 µg/ml ZL₃B ile yapılan antifungal duyarlılık testi sonucu



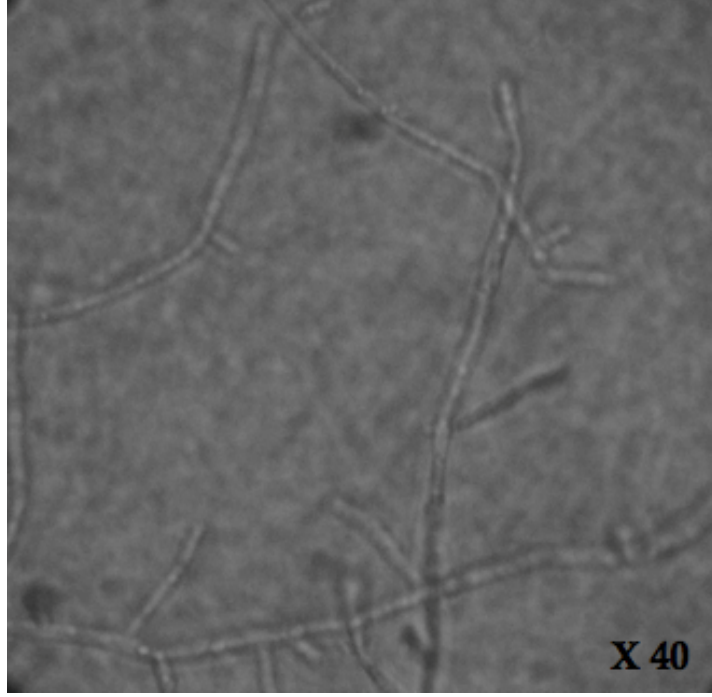
Şekil 4.2. 50 µg/ml ZL₃B yapılan antifungal duyarlılık testi sonucu



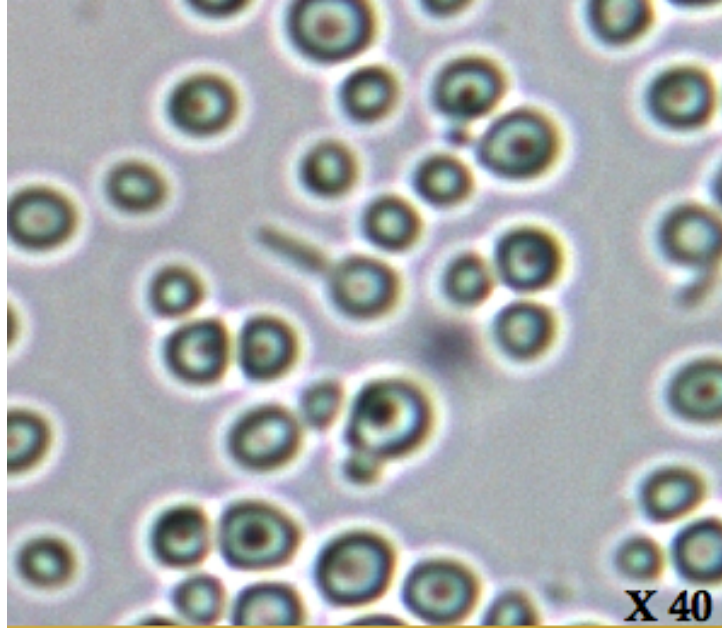
Şekil 4.3. 100 µg/ml ZL₃B yapılan antifungal duyarlılık testi sonucu

4.4. Oksidatif Metabolizma Testi

ZL₃B etken maddesinin oksidatif metabolizmaya olan etkisi, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml konsantrasyonlarda ZL₃B ile 0.5×10^3 - 2.5×10^3 CFU/ml konsantrasyonlarda *C. krusei* ATCC 6258 ve *C. albicans* ATCC 900028 maya hücreleri karşılaştırılarak, alamar blue kiti ile incelenmiştir. Boyaya mavi rengi veren rezasurin oksidatif metabolizma aktif ise mikroorganizma tarafından rezafurine dönüştürülür ve boya pembe renk alır. Spektrofotometre ölçümlerine göre, 25 µg/ml konsantrasyonundaki ZL₃B oksidatif metabolizma üzerine hiç etki göstermezken, 50 µg/ml, 100 µg/ml konsantrasyonlarda mikroorganizmaların oksidatif metabolizması inhibe edilmiştir. Sonuçlar üç yönlü varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiş, her üç grup arasındaki fark, anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu nedenle artan konsantrasyonlarda ZL₃B'nin oksidatif metabolizmayı inhibe ettiği söylenebilir. Şekil 4.4'de ZL₃B'nin artan konsantrasyonlarda oksidatif metabolizmaya olan etkisi renk değişikliği ile gösterilmiştir.



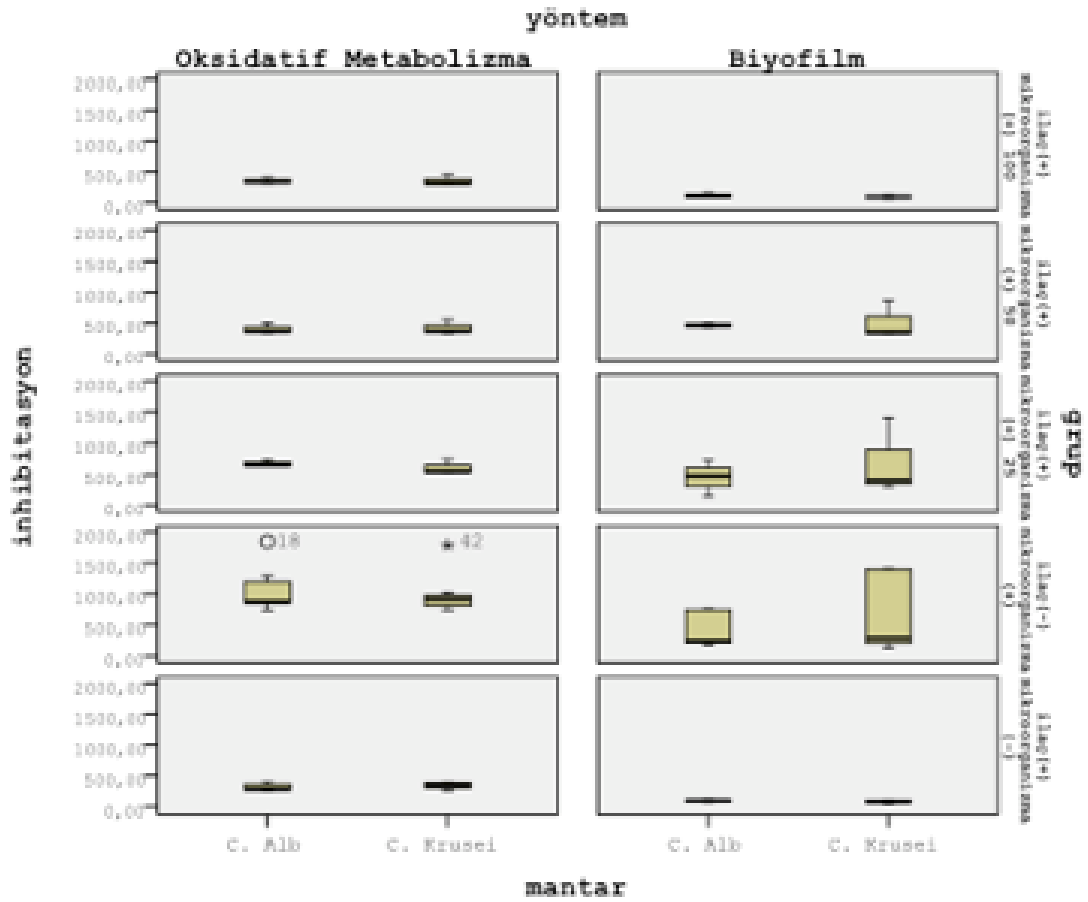
Şekil 4.6. 25 µg/ml konsantrasyonda ZL₃B'nin *C. krusei* ATCC 6258'in hif oluşumuna etkisi



Şekil 4.7. 25 µg/ml konsantrasyonda ZL₃B'nin *C. albicans* ATCC 90028'in germ tüp oluşumuna etkisi

4.6. ZL₃B'nin Biyofilm Oluşumuna Etkisi

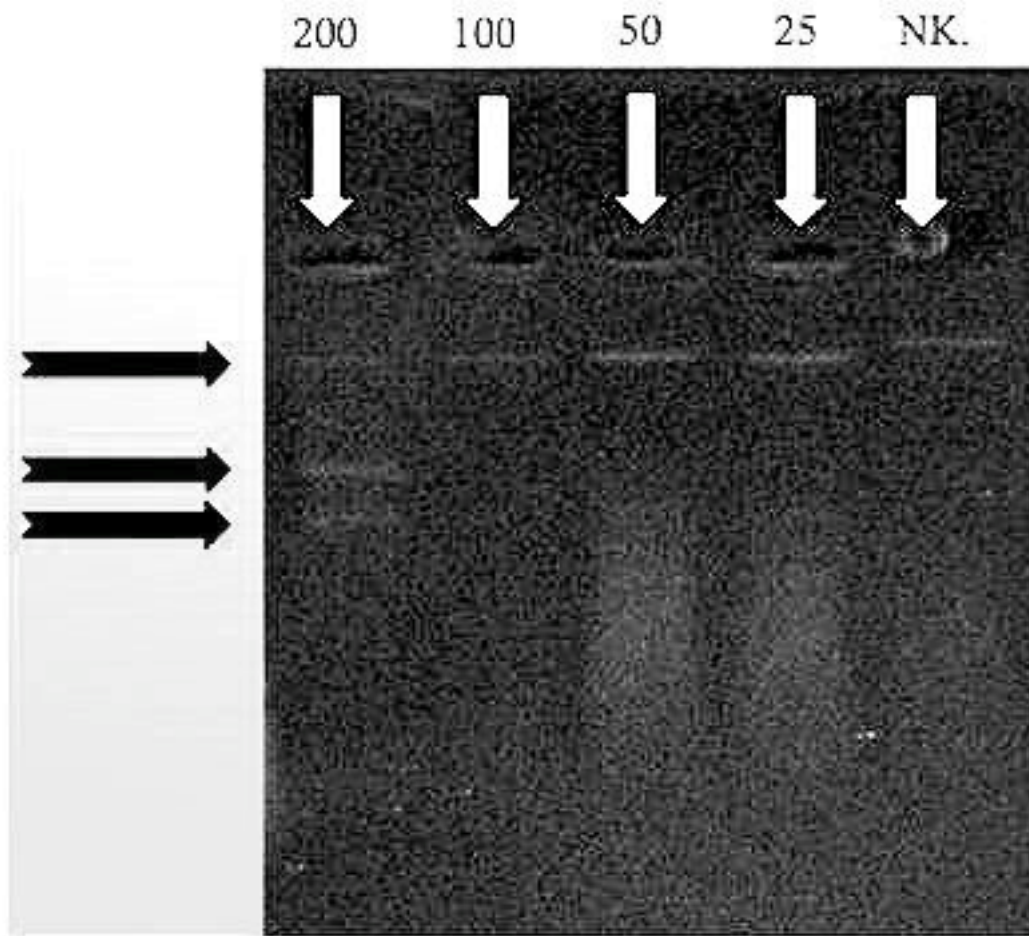
ZL₃B etken maddesinin biyofilm oluşumuna olan etkisi, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml konsantrasyonlarda ZL₃B ile 0.5×10^3 - 2.5×10^3 CFU/ml konsantrasyonlarda *C. krusei* ATCC 6258 ve *C. albicans* ATCC 900028 maya hücreleri karşılaştırılarak, mikropalak yöntemi ile incelenmiş ve spektrofotometre ölçümlerine göre, artan konsantrasyonlarda ZL₃B'nin biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gözlenmiştir. Sonuçlar üç yönlü varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiş, gruplar arasındaki anlamlı fark bulunamamıştır. Şekil 4.8'de ZL₃B'nin farklı konsantrasyonlarının oksidatif metabolizma ve biyofilm oluşumu üzerine inhibisyon etkisi grafikte gösterilmiştir.



Şekil 4.8. ZL₃B'nin oksidatif metabolizma ve biyofilm üzerine etkisi

4.7. ZL₃B'nin Apoptoz Etkisi

ZL₃B etken maddesinin apoptoz oluşturma etkisi, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda ZL₃B ile 0.5×10^3 - 2.5×10^3 CFU/ml konsantrasyonlarda *C. krusei* ATCC 6258 ve *C. albicans* ATCC 900028 maya hücreleri karşılaştırılarak kromozom kırıklarının tespiti ile gösterilmiştir. Şekil 4.9'da 200 µg/ml ZL₃B etkisi ile jel elektroforezinde görüntenen kromozom kırıkları gösterilmektedir.



Şekil 4.9. ZL₃B'nin apoptoz etkisi

5. TARTIŞMA

Vulvovajinal candidoz, dünyadaki en yaygın kadın sağlığı problemidir. %20–30’lu oranlarla, doğurganlık çağındaki kadınlarda, en sık görülen üç vajinal enfeksiyondan biridir. Epidemiyolojik çalışmalar kadınların %75’nin tüm hayatları boyunca en az bir kez, %40-50’sinin ise birden fazla vajinal candidoz atağı geçirdiğini göstermektedir. VVK, yüksek prevelansı ve yaşam kalitesini düşürmesi nedeniyle önemli bir klinik problemdir (Sobel, 2007).

Enfeksiyonların %80-90’ından *C. albicans* sorumludur. Bu mikroorganizmayı *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. crusei*, %5–10, %5 ve %1’lik oranlarla takip etmektedir. Prevelansları düşük olmasına rağmen, konvansiyonel antifungal ilaçlara dirençleri nedeniyle *non-albicans Candida* türleri bu hastalıkta önemli bir yere sahiptir. 1980 - 1990 yılları arasında ABD’de *candidal* vajinit insidansı yaklaşık iki kat artmıştır. Bu artış özellikle *C.albicans* dışı *candidalar* ile olan enfeksiyonlar lehinedir. Ancak bu artış İskandinav ülkelerinde yapılan çalışmalarda gösterilememiştir ve bu ülkelerde son 5 yıl içerisindeki insidansın %28 - 30 dolayında sabit kaldığı bildirilmiştir (Kent, 1991). Bizim araştırmamızda, vulvovajinal candidozlu tanısı almış hastalardan rastgele çalışmaya alınan 23 kökenin 11’i (%45.4) *C. albicans*, 8’i (%36.3) *C. glabrata*, 4’ü diğer *non- albicans Candida* türleri olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda da izole edilen vajinal *Candida* etkenleri arasında *non-albicans Candida*’lar daha fazla oranda saptanmıştır.

Candida daha çok doğurganlık çağındaki kadınlardan izole edilmektedir. Sağlıklı erişkin kadınların %10-55’inde asemptomatik vajinal kolonizasyon olduğu bildirilmektedir. Tekrarlayan VVK orta yaşlardaki kadınlarda daha fazla görülür, hastaların eğitim düzeyleri nispeten yüksektir. Çalışmamıza katılan hastalar arasında da en büyük grubu 18 kişi ile yine doğurganlık çağındaki kadınlar teşkil etmekteydi. Bu grubu 4 kişi ile menapoz ve 1 kişi ile prepubertal dönem izlemekteydi. Gebelik döneminde vajinal mantar taşıyıcılık oranı belirgin şekilde artar (Sobel, 2007).

Kontrol altına alınmamış diabetes mellitus ve buna eşlik eden glikozüri, vajinal sekresyonlardaki glikoz konsantrasyonunun artmasına ve ciddi semptomatik VVK'a neden olabilir. Perinedeki yerel ısı artışı ve ventilasyonun iyi olmaması vajinal *candida* kolonizasyonunu artıran önemli bir faktördür. Bu nedenle çok sıkı kıyafetler giyen, iç çamaşırını naylondan yapılmış olarak seçen kadınlarda tekrarlayan VVK görülebilir. Aynı şekilde lokal temizlik amacıyla kullanılan bazı antiseptik solüsyonlar, banyo materyalleri, çeşitli sabunlar, deodorantlar, yüzme havuzlarında kullanılan dezenfektan maddeler, tuvalet kağıtları, vajinal duş olarak kullanılan bazı solüsyonlar, hijyenik petler ve vajinal tamponlar vajinal mukozada irritasyon oluşturarak *candidal* kolonizasyon dolayısıyla da tekrarlayan VVK'ya yol açabilir (Sobel, 2007).

Tüm bu risk faktörlerine ilaveten oral kontraseptif ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, çinko eksikliği, hipotiroidizm, stres, cinsel ilişki sıklığı ve tekniği gibi faktörler de tekrarlayan VVK için risk faktörü olarak saptanmıştır. (Edman, 1986, Sobel, 2007).

Literatürdeki bu bilgiler ile uyumlu olarak, çalışmamızda yer alan hastaların 8'inde (%36.3) diabetes mellitus, oral kontraseptif kullanımı, hipotiroidi ve karaciğer sirozu gibi immunsupresif hastalıklar veya nefrotik sendrom ve transplantasyon planı gibi steroid kullanımı gerektiren durumlar, risk faktörleri arasındaydı.

Azollü formülasyonlara *Candida*'ların yalnızca, %50'lik bir kısmı cevap vermektedir. Ayrıca, hızla artan ilaç direnci problemi nedeniyle azollere dirençli *C. albicans* olguların da klinikte önemli bir sorun haline gelmiştir (Neves, 2008). Tekrarlayan VVK patogenezinde bir diğer teori tedavinin yetersiz olması ve vajinadan *candidaların* tamamen uzaklaştırılamamasıdır. Bu teoriyi destekleyen iki önemli faktör vardır. Bunlardan birincisi kültür negatif olan kadınların antibiyotik tedavisi esnasında hızla kültür pozitif hale gelmeleri, ikincisi ise başarılı bir lokal antimikotik tedavisinden 30 gün gibi kısa bir süre sonra %20-25 oranında kültür pozitif olguların saptanmasıdır. Burada olay tedaviyle vajinadaki canlı mantar sayısının çok azalması, ancak konvansiyonel kültür yöntemleri ile saptanamayacak kadar az sayıda mikroorganizmanın yine de vajinal lümende kalmasıyla

açıklanmaktadır (Sobel, 2007). Yeni CLSI kriterlerine göre, çalışmamıza dahil olan kökenlerden yalnızca 1 tanesi (%4.5) flukonazol dirençli bulunmuştur. Hastaların hepsi flukonazol ile tedavi almış ve bu preparat ile, kadın hastalıkları ve doğum kliniğimizin rutin uygulaması gereği yapılan 10 gün sonraki kontrollerinde kür sağlanmış görünmektedir. Ancak hastaların 30 gün-3 ay sonraki kontrolleri yapılmadığı için bu iyilik halinin devam edip etmediğini saptayamadık.

VVK'da en sık görülen semptom kaşıntıdır. Genellikle kokusuz koyu kıvamlı, beyaz renkli ve "peynir keşiği" görünümünde akıntı tipik muayene bulgusudur. Vajina hiperemik, vulva eritematöz görülür, serviks genelde normaldir. Vajinal hassasiyet, irritasyon, cinsel ilişki esnasında ağrı, vulvar bölgede kızarıklık ve yanma hissi, özellikle idrar yaparken yanma diğer semptomlardır. Tekrarlayan VVK'da ise kaşıntının yerini daha çok vajinada yanma hissi alır. Her ne kadar muayene bulguları ve semptomlara bakarak tanı konulabilse de laboratuvar ve kültür ile desteklemeden tedaviye gitmek yanıltıcı olabilir. Sadece semptomlara bakılarak VVK tanısı konulan hastaların %25'inde uygulanan ilk tedavi başarılı olmamaktadır. Bazı hastalarda tek bulgu hafif kaşıntı ve akıntı olabilir (Sobel, 2007). Bizim hastalarımızın ise, hastaların 14'ünde (%63.6) VVK lehinde en az bir bulgu mevcutken, 8'i (%36.3) asemptomatiktir.

Vulvovajinal candidozte amaç 48–72 saat içinde semptomların tamamen ortadan kaldırılması, 4–7 gün içerisinde de mikolojik kür sağlanmasıdır. Tedavide ilk tercih oral azol preparatlarıdır (imidazoller veya triazoller). Azoller ile tedavide kür sağlanamadığında lokal tedaviye geçilir. Borik asit lokal tedavi alternatifleri arasındadır. Oral terapinin lokal tedaviye üstünlüğü olmadığı buna ek olarak lokal tedavinin pek çok avantajı olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Vajinaya lokal olarak uygulanan antifungal ilaçlar, gereksiz ilaç absorpsiyonuna neden olmaz, dolayısıyla yüksek kan konsantrasyonu düzeylerini önler. İlaç etkileşimlerinin bu sayede önüne geçilir. Hamilelik ve emzirme sırasında oral tedavi rejimlerinden kaçınılır. Ayrıca lokal tedavi çok daha ucuz bir tedavi yöntemidir. Örneğin tek doz flukonazol (150 mg) ile tedavi maliyeti 26 USD iken, hali hazırda tedavide kullanılan 14 günlük lokal borik asit terapisinin maliyeti 5 USD 'dir (Neves, 2008). Hamilelerde ve emziren annelerde kullanılamaması, vajinal yanma ve irritasyon şikâyetlerine yol

açmasına rağmen, oral tedavi ile başarı sağlanamayan hastalarda en uygun alternatiftir (Prutting, 1998). İlaç direnci olan veya sık relaps görülen kronik vajinal candidozli olgularda yüksek tedavi başarısını gösteren pek çok çalışma vardır (Ray, 2007). Bu klinik gözlemden yola çıkarak araştırmacılar borik asitin pek çok yeni analogunu elde etmek için çalışmaktadırlar. Farklı organizmalara etki eden borik asit analogları bulunmuştur (Waasbergen, 2007; Jabbour, 2005; Baker, 2006).

Bortezomib (Velcade), FDA onayı almış ve parenteral kullanılabilen tek borik asit analogudur. Bir proteosome inhibitörüdür ve multiple myelom tedavisinde kullanılmaktadır. Sıtma paraziti üzerinde antiparaziter etkinliği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda kullandığımız, ZL₃B, bu preparatın, ticari olarak elde edilebilen tek formudur. Lokal borik asit tedavisi ile *Candida* üzerinde başarılı sonuçlar alınmış ancak bir borik asit analogu olan bu kimyasal daha önce *Candida* maya mantarı üzerinde hiç denenmemiştir. Borik asitin *Candida* maya mantarı üzerindeki etkinliğinden yola çıkarak yapmış olduğumuz çalışmamız bu anlamda bir ilktir. (Ray, 2007, Reynoulds, 2007).

Proteosom, hücre içinde yanlış yapılandırılmış ve ibikitinle işaretlenmiş proteinlerin yıkılmalarını sağlar. Regülatör proteinlerin ubiquitin aracılı yıkımı, hücre siklus progresyonu, sinyal ileti, transkripsiyonel düzenleme ve apoptozis gibi metabolik olayların kontrolünde önemli rol oynar. 20S proteosom mantarlardan insanlara kadar tün ökaryotlarda, iyi korunmuş ortak bir bölgedir. ZL₃B, bu proteosomun inhibitörüdür (Myung, 2001).

23 hasta kökeni ve 2 standart suş ile yapılan çalışmamızda, CLSI'nin M27-A3 kriterlerine göre uygulanan antifungal duyarlılık testlerine göre ZL₃B etken maddesinin MİK₅₀ değeri 25-50µg/ml konsantrasyon aralığında, MFK (Minimum fungusidal konsantrasyon) değeri ise 50-100 µg/ml konsantrasyon aralığında saptanmıştır. Flukonazole dirençli olan *C. glabrata* kökeni ancak 100µg/ml konsantrasyonda inhibe edilebilmiştir. Borik asitin, flukonazole karşı olan efflux pompası direncini önlediği ve *C. glabrata*'nın bu maddeye karşı duyarlı olduğuna ait çalışmalar literatürde bulunmakla birlikte, bizim çalışmamızda bu etkiye rastlanmamıştır. Deneylerin azol dirençli *Candida* suşları ile fenotipik ve moleküler

yöntemlerle kullanılarak tekrarlanması gerektiğini, eflux pompası üzerine olan etkinin araştırılması için daha ileri çalışmalar gerektiğini düşünmekteyiz (Seta, 2008).

Mitokondri apoptozis de merkezi bir role sahiptir. Elektron transport zincirinin bozulması, reaktif oksijen radikallerinin ortama salınmasına ve programlı hücre ölümüne neden olur (Shirliff, 2009)

Çalışmamızda elektron transport zincirindeki değişikliği saptamak ve mitokondrial apoptozisi incelemek amacıyla, ZL₃B'nin oksidatif metabolizmaya olan etkisi alamar blue kiti ile standart suşlar üzerinde incelendi. ZL₃B'nin 100-50 µg/ml konsantrasyonlarda oksidatif metabolizmayı inhibe ettiği gözlemlendi. Üçlü varyans analizi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.

Gerçek ve yalancı hif sentezi, germ tüp formasyonu metabolik faaliyetlerle yakından ilişkilidir. Mitokondride meydana gelen değişiklikler oksidatif metabolizmayı etkiler. Metabolizmanın inhibisyonu ile bu virulans faktörlerinin üretimi de durur (Sullivan, 1983).

Bizim çalışmamızda, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda ZL₃B, standart suşlarda; germ tüp, gerçek ve yalancı hif oluşumunu engellerken, 25 µg/ml konsantrasyonda bu etki gözlenmedi.

Hifa oluşumu ile biyofilm formasyonu birbirleriyle yakından ilişkilidir. Hifa açısından defektif mutantlarda biyofilm formasyonu gözlenmezken, hifa yapısının biyofilmin sağlamlığını artırdığı saptanmıştır (Brand, 2012).

Candida'nın vajinal mukozada biofilm oluşturduğu ve bu durumun tekrarlayan vajinal enfeksiyonlara neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Harriot, 2010). ZL₃B'nin biyofilm üzerine olan etkisini araştırmak amacı ile yaptığımız biyofilm deneylerinde, kullanmış olduğumuz konsantrasyonlar biyofilm oluşumunu engellememiş, farklı konsantrasyonlara ait gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak mikroorganizmaların planktonik formlarına ait inhibitör konsantrasyonları ile biyofilm inhibitör konsantrasyonları farklıdır

(Moskowitz, 2005). Biyofilm inhibitör konsantrasyonunun tespiti için daha yüksek konsantrasyonların ileriki çalışmalarda denenebileceğini düşünmekteyiz.

Apoptozisin en özgün bulgusu, hücre DNA'sının nükleozomlar arası bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu bulgu apoptozun son aşaması ve kesin göstergesidir (Wang, 2008).

Bizim çalışmamızda da 0.5×10^3 - 2.5×10^3 CFU/ml konsantrasyonda standart suşlar üzerinde 200µg/ml ZL₃B ile yapılan testlerde, üç saat sonunda jel elektroforezinde yapılan görüntüleme, apoptozun klasik bulgusu olan; kromozom kırıklarını gösteren merdiven DNA görüntüsüne rastlanmıştır.

Yapmış olduğumuz deneyler sonucunda ZL₃B etken maddesinin, *Candida* maya hücrelerinde; mitokondri üzerinden, oksidatif metabolizmayı inhibe etmek suretiyle antifungal etkinlik gösterdiği, yine aynı mekanizma ile germ tüp ve hifa oluşumunu da engellediği, apoptoza yol açtığı saptanmıştır. Pek çok kanser ilacının apoptosis üzerinden antifungal etkinliği araştırılmış olmakla birlikte, borik asit türevleri ile daha önce hiç çalışılmamıştır. Bu anlamda çalışmamız bir ilktir (Almeida, 2008).

Borik asit ve türevlerinin maya hücreleri üzerindeki apoptoz etkisinin tespiti için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji laboratuvarında, Haziran 2010- Aralık 2010 tarihleri arasında, rastgele seçilen, hastaların vajinal sürüntü örneklerinden standart yöntemlerle izole edilen 23 *Candida* örneği ve 2 standart köken (*C. albicans* ATCC 90028, *C. crusei* ATCC 6258) olmak üzere toplam 25 *Candida* izolatu üzerinde bir borik asit analogu olan ZL₃B maddesinin etkisi incelendi.

1. Çalışmaya alınan 23 kökenin 11'i (%45.4) *C. albicans*, 8'i (%36.3) *C. glabrata*, 4'ü diğer *non-albicans Candida* türleri olarak belirlenmiştir. İzole edilen vajinal *Candida* etkenleri arasında *non-albicans Candida*'lar daha fazla oranda saptandı.
2. Çalışmamıza katılan hastalar arasında da en büyük grubu 18 kişi ile yine doğurganlık çağındaki kadınlar teşkil etmekteydi. Bu grubu 4 kişi ile menapoz ve 1 kişi ile prepubertal dönem izlemektedir.
3. Literatürdeki bilgiler ile uyumlu olarak, çalışmamızda yer alan hastaların 8'inde (%36.3) diabetes mellitus, oral kontraseptif kullanımı, hipotiroidi ve karaciğer sirozu gibi immunsupresif hastalıklar veya nefrotik sendrom ve transplantasyon planı gibi steroid kullanımı gerektiren durumlar, risk faktörleri arasındaydı.
4. Çalışmamıza dahil olan kökenlerden yalnızca 1 tanesi flukonazol dirençli bulunmuştur. Hastaların hepsi flukonazol ile tedavi almış ve bu preparat ile, kadın hastalıkları ve doğum kliniğimizin rutin uygulaması gereği yapılan 10 gün sonraki kontrollerinde kür sağlanmış görünmektedir.
5. Hastaların 14'ünde (%63.6) VVK lehinde en az bir bulgu mevcutken, 8'i (%36.3) asemptomatiktir.
6. 23 hasta kökeni ve 2 standart suş ile yapılan çalışmamızda, CLSI'nin M27-A3 kriterlerine göre uygulanan antifungal duyarlılık testlerine göre ZL₃B etken

maddesinin $MİK_{50}$ değeri 25-50 μ M konsantrasyon aralığında, MFK değeri ise 50-100 μ M konsantrasyon aralığında saptanmıştır. Flukonazole dirençli olan tek *C. glabrata* kökeni 100 μ g/ml konsantrasyon ile inhibe edilmiştir.

7. ZL₃B'nin oksidatif metabolizmaya olan etkisi alamar blue kiti ile standart suşlar üzerinde incelendi. ZL₃B'nin 100-50 μ g/ml konsantrasyonlarda oksidatif metabolizmayı inhibe ettiği gözlemlendi. Üçlü varyans analizi ile, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml ve 100 μ g/ml grupları birbirleriyle, negatif ve pozitif kontroller ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.05$).
8. 50 ve 100 μ g/ml konsantrasyonlarda ZL₃B, standart suşlar üzerinde; germ tüp, gerçek ve yalancı hif oluşumunu engellerken, 25 μ g/ml konsantrasyonda bu etki gözlenmedi.
9. ZL₃B'nin 25, 50 ve 100 μ g/ml konsantrasyonlarının standart maya suşları üzerinde biyofilm oluşumuna etkisi gözlenmemiştir.
10. 200 μ g/ml ZL₃B ile yapılan testlerde, üç saat sonunda jel elektroforezinde yapılan görüntüleme, apoptozun klasik bulgusu olan; kromozom kırıklarını gösteren merdiven DNA görüntüsüne rastlanmıştır.

ÖZET

***Candida* Türleri Üzerine Bir Borik Asit Analogu Olan Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)₂ (ZL₃B)'nin İn-Vitro Etkinliğinin Araştırılması**

Vulvovajinal kandidoz, tüm dünyada, özellikle doğurganlık çağındaki kadınları etkileyen bir problemdir. Günümüzde mevcut olan ilaç terapileri, yüksek güvenilirlik ve etkinliğe sahip olsalar da, meydana gelen komplike enfeksiyonlar ve ilaç direnç problemi, araştırmacıları; yeni oral ve lokal terapötik alternatiflere yönlendirmektedir. Bu çalışmada, bir borik asit türevi ve proteosom inhibitörü olan ZL₃B'nin *Candida* türleri üzerine in vitro etki mekanizmasını araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda; Haziran 2010 - Aralık 2010 tarihleri arasında, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde VVK ön tanısı almış ve Cebeci Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji laboratuvarında kültürü yapılmış vajinal sürüntü örneklerinden, standart yöntemlerle izole edilen, rast gele seçilmiş 23 hasta örneği ve 2 standart köken (*C. albicans* ATCC 90028, *C. crusei* ATCC 6258) olmak üzere toplam 25 *Candida* izolatu kullanılmıştır. Çalışmaya alınan, 23 kökenin 11'i (%45.4) *C. albicans*, 8'i (%36.3) *C. glabrata*, 4'ü (%18,1) diğer *non- albicans Candida* türleri olarak belirlenmiştir.

Clinical and Laboratory Standarts Institute 'un M27-A3 kriterlerine göre mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan antifungal duyarlılık testleri sonucu, kökenlerden sadece bir tanesi flukonazol dirençli olarak tespit edilmiştir. ZL₃B etken maddesi, Minimum İnhibitor Konsantrasyon (MİK₅₀) değeri 25-50µg/ml konsantrasyon aralığında, Minimum Fungusidal Konsantrasyon (MFK) değeri ise 50-100 µg/ml konsantrasyon aralığında olmak üzere, *Candida* türleri üzerine fungusidal etki göstermiştir. Bu etkinin hangi yolla olduğunu göstermek amacıyla ZL₃B'nin; germ tüp ve hifa oluşumuna, oksidatif metabolizmaya, biyofilm oluşumuna, apoptoz üzerine etkileri incelendi.

Deneyle sonucunda; ZL₃B'nin 100-50 µg/ml konsantrasyonlarda oksidatif metabolizmayı, germ tüp, gerçek ve yalancı hif oluşumunu engellediği, 200µg/ml konsantrasyonda apoptozun klasik bulgusu olan kromozom kırıklarına neden olduğu saptanmıştır.

ZL₃B 'nin; 25, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonları standart maya suşları üzerinde biyofilm oluşumuna etkisi göstermemiştir. Ancak mikroorganizmaların, biyofilm inhibitör konsantrasyonları planktonik hücrelerini inhibe eden konsantrasyonlarından çok daha yüksek olduğundan, farklı konsantrasyonlar ile deneylerin tekrarlanması gerekmektedir.

ZL₃B'nin 20S proteosomu inhibe ederek apoptoza yol açtığını düşünmekteyiz ancak borik asit ve türevlerinin maya hücreleri üzerindeki bu etki mekanizmasının tespiti için daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Sözcükler: *Candida*, borik asit, vulvovajinal kandidoz, antifungal duyarlılık testi, proteosom inhibitörleri

SUMMARY

Investigation of In-Vitro Effects of an Boric Acid Analog Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)₂ (ZL₃B) on *Candida* Species

Vulvovaginal candidosis is a common worldwide female medical problem, occurring mostly in women of childbearing age. Although current vulvovaginal candidosis drug provides high efficacy and safety, the recent emergence of complicated infections and drug resistance has led to the development and research of new oral and local therapeutic options. In this study, we aimed to evaluate invitro activity of mechanism of ZL₃B which is a boric acid analog and a proteasome inhibitor.

Randomly selected 25 strains (23 patient and 2 standart *C. albicans* ATCC 90028, *C. crusei* ATCC 6258) were included in this study which is isolated by standart methods at Ankara University Medical Faculty Cebeci Central Microbiology Laboratory, from the patients entered Gynaecology and Obstetric Clinic of the same hospital with symptoms of VVC between June 2010- December 2010. Of the isolates 11 (45.4%) were *C. albicans*, 8 (36.3%) were *C. glabrata* and 4 (18,1%) *non-albicans Candida*.

Antifungal susceptibility tests were performed according to the Clinical and Laboratory Standarts Institute criteria (M27- A3) with microdilution method and only 1 strain was confirmed as fluconazole resistant. ZL₃B showed a fungicidal activity with 25-50µM minimum inhibitory concentration and 50-100 µM minimum fungicidal concentration. To investigate the activation mechanism of ZL₃B we did several experiments about germ tube and hypha formation, oxidative methabolism, biofilm formation and apoptosis.

Our results showed that ZL₃B inhibits oxidative metabolism, germ tube and hypha formation at concentrations of 100-50 µg/ml and causes chromosome breaks which is the classical evidence of apoptosis with 200 µg/ml concentration.

25, 50 ve 100 µg/ml concentrations of ZL₃B didn't show any effect on biofilm formation. However according to literature biofilm inhibitor concentrations on microorganisms are much more higher than planktonic inhibitor concentrations because of this we think that biofilm experiments can be repeated with higher concentrations.

We estimate that ZL₃B causes apoptosis of *Candida* species by inhibiting proteasome pathway but further studies are necessary to determine boric acid and its derivates effect on apoptosis.

Key words: *Candida*, boric acid, vulvovaginal candidosis, antifungal susceptibility tests, proteasome inhibitors

KAYNAKLAR

- Adams, J., Behnke, M., Chen, S. (1998). Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett* 8:333-338.
- Alberts B., Johson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2007) *The Cell*. Fifth Edition: 1115-1129
- Almeida, B., Silva, A., Mesquita, A., Sampaio-Marques, B., Rodrigues, F., Ludovico, P. (2008). Drug-induced apoptosis in Yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783: 1436-1448.
- Armstrong, T.A., Spears, J.W, Crenshaw, T.D. (2000). Boron supplementation of a semipurified diet for weanling pigs improves feed efficiency and bone strength characteristics and alters plasma lipid metabolites. *J. Nut* 130:2575-2581.
- Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jarvis W R, Horan T, Edwards JR, Tolson J, Henderson T, Martone WJ. Secular Trends in Nosocomial Primary Bloodstream infections in the United States. *Am J Med* 1991; 16: 86-89.
- Baker, S.J., Akama, T., Zhang, Y.K., Sauro, V., Pandit, C., Singh, R., Kully, M., Khan, J., Plattner, J., Benkovic, S.J., Lee, V., Maples, K. (2006). Identification Of A Novel Boron Containing Antibacterial Agent (AN0128) With Anti-Inflammatory Activity, For The Potential Treatment Of Cutaneous Diseases. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters* 16; 5963-5967.
- Barr, R.D., Barton, S.A., Schull, W.J. (1996). Boron levels in man: Preliminary evidence of genetic regulation and some implications for human biology. *Med Hypotheses* 46: 286-289.
- Benkovic, S.J., Baker, S.J., Aleey, M.R.K., Woo, Y.H., Akama, T., Mao, W.M., Baboval, J., Rajagopalan, P.T.R., Wall, M., Kahng, L.S., Tavassoli, A., Shaphiro, L. (2005). Identification of boronic acid esters as inhibitors of bacterial cell growth and bacterial methyltransferases. *J Med Chem* 48: 7468-7476.

- Bernardis, F., Lorenzini, R., Verrichio, R., Agatensi, L., Cassone, A. (1989). Isolation acid proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida parapsilosis* from outpatients with vaginitis. *J Clin Microbiol* 27: 2598 -03.
- Bochmann, G.A., Burd, I.D., Ebert, G.A. (2000). Menopausal sexuality In Menopause, Biology and Pathobiology (ed. Kelsey L.J., Morcus R.), pp.1224-26. Academic Press: San Diego.
- Brand A. (2012). Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence, *International Journal of Microbiology*: Article ID 517529
- Calderone, R.A., Fonzi, W.A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9: 327-35.
- Chemaly, R.F., Procop, G.W., Sarıbaş, Z., Arıkan, S. (2006). Patojen Mantarların Moleküler Yöntemlerle Saptanması ve Tanımlanması. In Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar (ed. Tenover F.C., Versolovic J., Tang Y.W., Unger E.R., Relman D.A., Tekeli A., Ustaçelebi Ş.). pp. 551-559. Palme Yayıncılık: Ankara.
- Christie, G., Markwell, R.E., Gray, C.W. (1999). Alzheimer's disease: correlation of the suppression of amyloid peptide secretion from cultured cells with inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *J Neurochem* 73: 195-204.
- Clarkson, P.M., Rawson, E.S. (1999). Nutritional supplements to increase muscle mass. *Crit Rev Food Sci Nutr* 39:317-328.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-second edition. CLSI document M27-A3 (Vol 28 No:14), NCCLS Wayne, Pennsylvania, U.S.A., 2002.
- Coutts, S.J., Kelly, T.A., Snow, R.J. (1996). Structure-activity relationships of boronic acid inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. 1. Variation of the P2 position of XaaboroPro dipeptides. *J Med Chem* 39: 2087- 2094.
- Çerikçioğlu, N. (2002). *Candida Türleri*. In Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Cilt 2” (eds. Topçu Willke A., Söyletir G., Doğanay M.) pp. 2411-27, Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul.

- Cuenca-Esterella, M.C.B., Moore, F., Barchiesi, J., Bille, E., (2003). AFST Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (AFST-EUCAST). *Clin. Microbiol. Infect* 9:467-474.
- Dolan R, Biofilms and Device-Associated Infections, Centers for Disease Control and Prevention Atlanta, Georgia, USA.
- Dolapçı, İ. Tekeli, A. (2002). Çeşitli *Candida türlerinde* slime faktörü yapımının araştırılması. *Mikrobiyol Bült* 36: 323-28.
- Dostal, J., Hamal, P., Pavlickova, L., Soucek, M., Rumi, T., Pichova, I., Hruskova, O. (2003). Simple method for screening *Candida species* isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the predication of successful inhibitory treatment. *J Clin Microbiol* 41:712-16.
- Edman J, Sobel JD, Taylor ML. Zinc status in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol.* 1986; 155: 1082 - 5.
- Ellepola, A.N.B., Morrison, C.J. (2005). Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *The J. Microbiol* 43:65.
- Ener, B. (1999). Hastane enfeksiyonu etkeni olarak mantarlar In Temel ve Klinik Mikrobiyoloji (ed. Ustaçelebi Ş). pp. 1123-27 Güneş Kitapevi,1. Basım: Ankara.
- Espinel-Ingroff, A.M., Pfaller, M., Erwin, M.E., Jones, R.N. (2003). In Vitro Susceptibility test methods; yeasts and filamentous fungi. *Manual of clinical microbiology* 9(2).
- Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M., Messer, S.A. (2004). Multicenter comparison of the sensititre Yeast one calorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *J.Clin. Microbiol* 42:718-721.

- Espinel-Ingroff, A., Barchiesi, F., Cuenca-Esterella, M., Pfaller, M.A. (2005). Comparison of visual 24-hour and spectrophotometric 48-hour MICs to CLSI microdilution MICs of fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole for *Candida* spp: a collaborative study. *J.Clin. Microbiol* 43:4535-4540.
- Espinel-Ingroff A., Barchiesi, F., Cuenca-Esterella, M., Pfaller, M.A. (2005). International and multicenter comparison of EUCAST 7.1 and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. To fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *J.Clin. Microbiol* 43:3884- 889.
- Fusayama T. (1997). The process and results of revolution in dental caries treatment. *Int Dent J.* 47: 157-166.
- Gaby, A.R. (1999). Natural elements for osteoarthritis. *Altern Med Rev* 4:330-341.
- Ghannoum, M.A. (2000). Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13: 122-143.
- Groettrup, M., Schmidtke, G. (1999). Selective proteasome inhibitors: modulators of antigen presentation. *Drug Discov Today* 4:63-71.
- Groziak, M. (2001). Boron Therapeutics on the Horizon, *American Journal of Therapeutics* 8: 321–328.
- Harriot, M.M., Lilly, E.A., Rodriguez, T.E., Fidel, P.L., Nover, Mc. (2010). *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology* 156: 3635-44
- Haynes, K. (2001). Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol.* 9: 591- 96.
- Hazen, K.C. (2004). Relationship between expression of cell surface hydrophobicity protein 1 (CSH1p) and surface hydrophobicity properties of *Candida dubliniensis*. *Curr Microbiol* 48: 447 - 51.
- Hazen, K.C., Howell, S.A. (2003). *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of Medical Importance. In: Murray PR. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. (eds. Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover JC). pp.1296-99 ASM Pres: Washington.

- Hostetter, MK. (1994). Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida spp.* with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev* 7:29-37.
- Hopfer, R.L., Orengo, A. (1980). Radiometric detection of yeast in blood cultures of cancer patients. *J Clin Microbiol* 12: 329-31.
- Jabbour, A., Srebnik, M., Zaks, B., Dembitsky, V., Steinberg, D. (2005). Evaluation Of Oxazaborolidine Activity On *Streptococcus mutans* Biofilm Formation. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26: 491-496.
- Jarwis, W.R. (1995). Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. *Clin Infect Dis* 20:1526-1530.
- Kent, H.L. (1991). Epidemiology of vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 165: 1168-76.
- Lee, S.L., Alexander, R.S., Smallwood, A. (1997). New inhibitors of thrombin and other trypsin-like proteases: hydrogen bonding of an aromatic cyano group with a backbone amide of the P1 binding site replaces binding of a basic side chain. *Biochemistry* 36: 13180-13186.
- Lehtonen, L., Anttila, V.J. (1996). Diagnosis of disseminated candidiasis by measurement of urine D- arabinitol/L-arabinitol ratio. *J Clin Microbiol* 34: 2175-9.
- Litovitz, T. L., Klein- Schwatz, W., Oderda, G.M. (1988). Clinical Manifestations of toxicity in a series of 784 boric acid ingestions. *Am J Emerg Med* 6: 209-213.
- Luo, G., Samaranayake, L.P., Yau, J.Y. (2001). *Candida species* exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol* 39: 2971 -74.
- MacPherson, S., Akache, B., Weber, S., De Deken, X., Raymond, M. and Turcotte, B. (2005). *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1745-1752.
- Maertens, J., Deeren, D., Dierickx, D. (2007). Theunissen. Preemptif antifungal tedavi. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2(1).

- Mardegan, R., Foglio, M., Gonçalves, R., Hofling, J. (2006). *Candida albicans* proteinases. *Braz. J. Oral Sci* 5: 944 -52.
- Maruyama, T., Kanajii, T., Nakade, S. (1997). 2APB, 2-ethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins (1,4,5) P₃ induced Ca release. *J Biochem* 122: 498-505.
- Masuoka, J., Hazen, K. C. (2004). Cell wall mannan and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* serotype A and b strains. *Infect Immun* 72: 6230-36.
- Medoff, G. (1988). Vanden bossche H ed all. The mechanism of action of amfotericin B, p161-164., international Syposium on aspergillus and aspergillosis 161- 164.
- McCue, JD. (1989). Evaluation and management of vaginitis. *Arch Intern Med* 149: 565 - 8.
- McGinnis, M.R., Nunn, G.B., Sarıbaş, Z., Arıkan, S. (2006). Mantarların Dizi Analizine Dayalı Tanımlanması ve Sınıflandırılması. In: Persing DH Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. (eds. Tenover FC, Versolovic J, Tang Y-W, Unger ER, Relman DA, Tekeli A, Ustaçelebi Ş.). pp.551-559 Palme Yayıncılık; Ankara.
- McLintock, L.A., Jones, B.L. (2004). Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in hemato-oncology patients. *Br J Haematol* 126: 289-297.
- Monod, M., Capoccia, B., Lechenne, B., Zaugg, C., Holdom, N. (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int J Med Microbiol* 292: 405 -19.
- Morace, G., Amato, G., Bistoni, F., Fadda, G. (2002). Multicenter comparative valuation of six commercial systems and the national committee for clinical laboratory standards M27-A broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 40:2953-8.
- Moreira, D., Paula, C.R. (2006). Vulvovaginal candidiasis. *Int J Gynecol Obstet* 92: 266 -67.

- Morrison, C.J., Hurst, S.F., Reis, E. (2003). Competitive binding inhibition enzyme- linked immunosorbent assay that uses the secreted aspartyl proteinase of *Candida albicans* as antigenic marker for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* 10:835-848.
- Moskowitz, S. (2005). *J. Clin. Microbiol*, 42:1915-22
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S. and Tenover, M.A. (2007). Fungal classification, structure and replication Medical Microbiology. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier 5:67.
- Mushowitz S. (2004) Comparison of biofilm and planktonic susceptibility testing of CF *P. aeruginosa* isolates. *J. Clin Microbiology*. 42: 1915-22
- Myung, J., Kim, B.K., Crews, C.M. (2001). The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Proteasome Inhibitors. *Medicinal Research Reviews* 21; 245-273.
- Naghii, M.R., Samman, S. (1993). The role of boron in nutrition and metabolism. *Prog Food Nutr Sci* 17:331-349.
- Naglik, J.R., Chalacombe, S.J., Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase in virulence and pathogenesis. *Microbiol Rev* 67: 400 – 428.
- Naglik, J.R., Rodgers, C.A., Shirlaw, P.J., Dobbie, J.L., Naglik, L.F., Greenspan, D., Agabian, N., Chalacombe, S.J. (2003). Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis* 188: 469- 79.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Approved Standard, 3rd ed. NCCLS document M27-A3, Wayne, 2010
- Neves, J., Pinto, E., Teixeira, B., Dias, G., Rocha, P., Cunha, T., Santos, B., Amara, M., Bahia, M. (2008). Local Treatment Of Vulvovaginal Candidosis. *Drugs* 68 (13): 1787–1802.
- Nielsen, F.H. (2000). The emergence of Boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition* 16: 512-514.

- Nomanbhoy, F., Steele, C., Yano, J., Fidel, PL. (2002). Vaginal and oral epithelial cell: Anti- *Candida* activity. *Infect Immun* 70: 7081-88.
- Ostrosky-Zeichner, L., Alexander, B., Kett, D. (2005). Multi-center clinical evaluation of the (1 3) beta-D- glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* 41:654- 659.
- Özpeker, Ö. (2001). Bor Yataklarının Değerlendirilmesi Türkiye Borat Yatakları, Workshop, İTÜ Maden Fakültesi. (eds. Kmkoglu, S., Budakoglu, M., Çelenli, A.) 57-68.
- Parsek, M. (2003). BACTERIAL BIOFILMS: An Emerging Link to Disease Pathogenesis, *Annual Review of Microbiology*, Vol. 57: 677-701.
- Pascual A. (2002). Pathogenesis of catheter-related infections: Lessons for new designs. *Clin Microbiol Infect* 8:256-64.
- Paul, L., Sobel, J.D. (2002). Host defense against vaginal candidiasis. (eds. Calderone RA.). pp.193 - 211, ASM Press: Washington DC.
- Penyige, A., Deak, E., Kalmanczhelyi A. (1996). Evidence of a role for NAD glycohydrolase and ADP- ribotransferase in growth and differentiation of *Streptomyces griseus* NRRL B-2682: inhibition of m-aminophenylboronic acid. *Microbiol* 142: 1937-1944.
- Peter, G.P., Carol, A.K., David, A., Daniel, K.B., Thierry, F.C., John, E.E., Scott, G.F. (2009). Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis 4.
- Pirinççiler, M. (1995). Maya mantarlarının tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılığı (Tez). On Dokuz Mayıs Üniversitesi: Samsun.
- Pivazyan, A.D., Matteson, D.S., Fabry- Asztalos, L. (2000). Inhibition of HIV-1 protease by a boron modified polypeptide. *Biochem Pharmacol* 60:927-936.
- Prutting, S.M., Cervený, J.D. (1998). Boric Acid Vaginal Suppositories: A Brief Review. *Infectious Diseases In Obstetrics And Gynecology* 6.191–194.
- Pujol, C., Daniels, K.J., Lochart, S.R., Srihantha, T., Radke, J.B, Greiger J., Soll, D.R. (2004). The closely related species *Candida albicans* and *Candida dublinensis* can mate. *Eukaryotic cell* 3 (4) : 1015-1027.

- Ray, D., Goswami, R., Banerjee, U., Dadhwal, V., Goswami, D., Mandal, P., Sreenivas, V., Kochupillai, N. (2007). Prevalence Of *Candida glabrata* And Its Response To Boric Acid Vaginal Suppositories In Comparison With Oral Fluconazole In Patients With Diabetes and Vulvovaginal Candidiasis. *Diabetes Care* 30(2):312–317.
- Rainey, C.J., Nyquist, L.A., Christensen, R.E. (1999). Daily boron intake from the *American diet. J Am Diet Assoc* 99: 335-340.
- Restuccio, A., Mortensen, M.E., Kelly, M.T. (1992). Fatal ingestions of boric acid in an adult. *Am J Emerg Med* 10: 545-547.
- Reynolds, J., Bissati, K.E., Brandenburg, J., Günzl, A., Mamoun, C. (2007). Antimalarial Activity Of The Anticancer And Proteasome Inhibitor Bortezomib And Its Analog ZL3B. *BMC Clinical Pharmacology* 7: 13.
- Rezanka, T., Sigler, K. (2008). Biologically active compounds of semi-metals, *Phytochemistry* 69: 585-606.
- Rimek, D., Redetzke, K., Singh, J., Heinrich, K., Kappe, R. (2004). Performance of the *Candida* mannan antigen detection in patients with fungemia. *Mycoses* 47: 23-26.
- Rudek, W. (1978). Esterase activity in *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 1978, 8: 756-759.
- Samman, S., Naghii, M.R., Lyons Wall, P.M. (1998). The nutritional and metabolic effects of boron in humans animals. *Biol Trace Elem Res* 66:227-235.
- Samonis, G., Gikas, A., Toloudis, P., Maraki, P., Vrentzos, G., Tselentis, Y., Tsaparas, N. and Bodey, G. (1993). Prospective evaluation of effects of broad-spectrum antibiotics on gastrointestinal yeast colonisation of humans. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 51-53.
- Schaller, M., Borelli, C., Korting, H., Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 48: 365 -77.

- Schuetzer-Muehlbauer, M., Willinger, B., Krapf, G., Enzinger, S., Presteri, V., Kuchler, K. (2003). The *Candida albicans* cdr2p ATP-binding cassette transporter confers resistance to caspofungin. *Mol.microbiol* 48:225-235.
- Segal, E. (2005). *Candida*, still number one-what do we know and where are we going from there? *Mycoses* 48 (11);3.
- Seta, F.D., Schmidt, M., Essmann, B.V., Larsen, B. (2009). Antifungal mechanisms supporting boric acid therapy of *Candida* vaginitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63: 325-336
- Shirtliff, M., Krom B., Meijering R., Peters B., Zhu J., Scheper M., Harris M., Rizk M. (2009) Franesol induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents Chemoter*
- Skrbec, V.L., Birman, E.G., Cury, A.E., Paula, C.R. (2003). Yeasts from the oral activity of children with AGDS: exoenzyme production and antifungal resistance. *Ped Odontol Bras* 17:217-22.
- Sobel J. (2007). Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 369: 1961-71
- Soloway, A., Tjarks, W., Barnum, B., Rong, F., Barth, R., Codogni, I., and Wilson, J. (1998). The Chemistry of Neutron Capture Therapy, *Chem. Rev* 98, 1515.
- Spimillo, A., Bernurzi, A.M., Cevini, C., Gulminetti, R., Luzi, S. (1997). The relationship of bacterial vaginosis *Candida* and *Trichomonas* infection to symptomatic vaginitis in post menopausal women attending a vaginitis clinic. *Maturitas* 27: 253- 60.
- Stehr, F., Felk, A., Kretschmar, M., Schaller, M., Schafer, W., Hube, B. (2000). Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections. *Mycoses* 43:17- 21.
- Stevens D A. Dignosis of fungal infections: current status. *J.Antimicrob Chemother*, 2002; 49(11):11.
- Sullivan, P.A., Yin C.Y., Molley C., Templeton M.D., Shepherd M.G. (1983). An analysis of the metabolism and cell wall composition of *Candida albicans* during germ-tube formation. *J. Microbiology* 11: 1514-25

- Sullivan, D.J., Coleman, D.C. (2002). Molecular Approaches to Identification and Typing of *Candida* Species In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC, *American Society for Microbiology press*, 427-441.
- Tümbay, E. (1999). *Candida* türleri. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji (ed Ustaçelebi Ş).
- Trama, J.P., Adelson, M.E., Raphaelli, I., Stemmer, S.M., Mordechai, E. (2005).
- Tsuboi, R., Komatsuzaki, H., Ogawa, H. (1996). Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some its properties. *Infect Immun* 64(8) : 2936-2940.
- Detection of *Candida species* in vaginal samples in a clinical laboratory setting. *Infect Dis Obstet Gynecol* 13: 63 -7.
- Türetgen A. (2006). Su şebeke sistemlerinde mikrobiyal biyofilm tabakası, *Tesisat Mühendisliği Dergisi* 92: 29-32.
- Upton, A., Leisenring, W., Marr, K. (2006). (1-3) beta-D-Glucan assay in the diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Infect Dis* 42:1054-1056.
- Usluer, G. (2008). Vajinal Enfeksiyonlar In Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Cilt 1 (eds. Topçu Willke A., Söyletir G., Doğanay M.). pp. 1519 -1522, *Nobel Tıp Kitabevleri*: İstanbul.
- Vacca, J.P. (2000). New advances in the discovery of thrombin and factor Xa inhibitors. *Curr Opin Chem Biol* 4:394-400.
- Verweij. P.E., Meis, J.F. (2000). Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2:80.
- Waasbergen, L.G., Fajdetic, I., Fianchini, M., Rasika Dias, H. V. (2007). Antimicrobial Properties Of Highly Fluorinated tris (pyrazolyl) borates. *Journal of Inorganic Biochemistry* 101: 1180–1183.
- Whiting, P., Rutjes, A.W.S., Reitsma, J.B. (2004). Sources of variation and bias in studies of diagnostic accuracy. A systematic review. *Ann Intern Med* 140:189-202.

Willinger, B. (2006). Laboratory diagnosis and therapy of invasive fungal infections
Current Drug Targets 7:513-522.

Witkin, S.S., Jeremias, J., Ledger, W.J. (1989). Vaginal eosinophils and IgE antibodies to *Candida albicans* in women with recurrent vaginitis. *J Med Vet Mycol.* 27: 67-8.

www.biomerieux.com

www.boren.gov.tr

www.cdc.gov

www.invitek.de/product.gov

Wang, X., Adams, Jerry, Green., D., Nagata, S. (2008). Apoptosis. *Molecular biology of the cell* (eds. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.) pp. 115-1129, *Garland Science, Taylor&Francis Group*: USA

Yang, YL. Virulence factors of *Candida species*. *J Microbiol Immun Infect.* 2003; 36: 223 - 28.

Yeo, S.F., Wong, B. (2002). Current status of nonculture methods for the diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 15: 464-485.

York, M.K., Hillier, S.L. (2004). Genital Cultures In *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd Ed. Section 3.9.1. (ed. Isenberg HD).

Young, L.Y., Hull, C.M., Heitman, J. (2003). Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amfoterisin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrob AgentsChemother* 47: 2717-2724.

Yücesoy, M., Yuluğ, N. (1999). *Candida* türlerinde fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. *Enfeksiyon Derg* 13: 569 - 74.

Yücel, A., Kantarcıoğlu, A.S. (2000). *Candida*'ların Patojenlik Belirtgenleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 31: 172 - 86.

Yücel, A., Kantarcıoğlu, A.S. (2001). *Candida albicans* kökenlerinde bazı virulans faktörlerinin (fosfolipaz, çimleme borusu ve aderens) ve aralarındaki korelasyonun belirlenmesi. *İnfek Derg* 15: 517-25.eme