

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

**FUNGAL ENFEKSİYONLARDA DENDRİTİK
HÜCRELERDEN İFADELENEN TOLL-LIKE
VE KEMOKİN RESEPTÖRLERİNİN ROLÜ**

DOKTORA TEZİ

Emine YEŞİLYURT

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Işıl FİDAN

ANKARA
Ocak 2013

TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimine başlamamda büyük katkıları bulunan Sayın Prof. Dr. Nedim Sultan' a; eğitimim boyunca, yaşamımın her alanında ve tez çalışmamda bana her zaman destek olan ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Işıl Fidan' a; kendisinden her alanda çok şey öğrendiğim ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim Sayın Prof. Dr. Ayşe Kalkancı' ya; gülümsemesi ile bana umut veren Sayın Prof. Dr. Z. Ceren Karahan' a; her zaman yanımda olan arkadaşım Biokim. Serap Yıldırım' a, beni sabırla dinleyip umut veren, desteğini esirgemeyen Uzm. Dr. M. Cihat Oğan' a ve sevgili aileme sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1-3
2. GENEL BİLGİLER	4
2. a. Tarihçe	4
2. b. Taksonomi	4
2. c. Ekoloji	4-5
2. d. Mikrobiyolojik Özellikler	5-6
2. e. Hücre Yapısı	6-7
2. f. Virulans Faktörleri	7-8
2. f. 1. Yapışma (Aderans)	8
2. f. 2. Morfolojik Değişim	9
2. f. 3. Fenotipik Değişim	9-10
2. f. 4. Toksinler ve Enzimler	10
2. f. 5. Biyofilm Oluşumu	10-11
2. g. Candida Enfeksiyonları ve Patogenez	11
2. g. 1. İmmunopatogenez	12-13
2. g. 1. 1. Toll-like reseptörler (TLR)	14
2. g. 1. 1. a. TLR' lerinin Yapısı ve İletim Mekanizmaları	14-17
2. g. 1. 1. b. TLR ve Efektör Yanıt	17-18
2. g. 1. 1. c. Toll-like Reseptör Ailesi Üyeleri	18-20
2. g. 1. 1. c. 1. TLR2	20
2. g. 1. 1. c. 2. TLR4	21-22
2. g. 1. 1. c. 3. TLR6	22-23
2. g. 1. 1. d. TLR' lerin Ligandları (Bağlayıcıları)	23-24
2. g. 1. 1. e. TLR Sinyal Yolu	25-26
2. g. 1. 1. f. TLR' lerin İmmun Yanıt Etkileri	26-28

2. g. 1. 1. g. TLR' ler Aracılığı ile Mikrobiyal Tanıma	29
2. g. 1. 1. g. 1. Fungal Tanınma	29
2. h. Kemokinler	30
2. h. 1. Kemokinlerin Yapı ve Fonksiyonları	30-32
2. h. 2. Kemokin Aileleri	32-36
2. h. 2. 1. CXC Kemokin Ailesi (α kemokinler)	36
2. h. 2. 2. CC Kemokin Ailesi (β kemokinler)	37-38
2. h. 2. 3. C Kemokin Ailesi (γ kemokinler)	38
2. h. 2. 4. CX3C Kemokin Ailesi (δ kemokinler)	38-41
2. h. 3. Kemokinlerin Rol Aldığı Olaylar	41-43
2. h. 4. Kemokin Üretimi ve Etkileri	43
2. h. 5. Enfeksiyon Hastalıklarında Kemokinlerin Rolü	44
2. h. 6. CCR5	44-45
2. h. 7. CX3CR1	46
2. h. 8. CXCR4	46
2. ı. Dendritik hücreler	46-47
2. ı. 1. Fonksiyonları	47-50
2. i. Kandidozda Tanı	50-51
2. i. 1. Polymerase Chain Reaction (PCR)	51-54
2. i. 1. 1. DNA Polimeraz	55
2. i. 1. 2. Deoksinükleozid Trifosfatlar (dNTPs)	55-56
2. i. 1. 3. Tamponlar	56
2. i. 1. 4. $MgCl_2$	56-57
2. i. 1. 5. Sıcaklık Döngüleri	57
2. i. 1. 6. Hedef	58-59
2. j. RT-PCR	59-60
2. k. ELISA	60-62
2. k. 1. ELISA Yönteminin Uygulanması	62-63
2. k. 2. ELISA Sonuçlarının Değerlendirilmesi	63-64
2. l. <i>Candida</i> - TLR ve Kemokin İlişkisi	64-65

3. GEREÇ VE YÖNTEM	66
3. 1. Gereçler	66
3. a. 1. Cihazlar	66-67
3. a. 2. Kimyasallar	67-68
3. a. 3. Suşlar	68
3. b. Yöntemler	69
3. 2. 1. <i>C. albicans</i> ve <i>C. krusei</i> Suşlarının Hazırlanması	69
3. 2. 1. a. <i>C. albicans</i> ve <i>C. krusei</i> suşları	69
3. 2. 2. İnsan Mononükleer Hücre Kültürünün Hazırlanması	70
3. 2. 2. a. Besiyerinin Hazırlanması	70
3. 2. 2. b. İnsan Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinin (MNH) İzolasyonu	70
3. 2. 2. c. MNH Hücrelerin Canlılık Kontrolü	71
3. 2. 3. MNH' lerden DH' lerin Oluşumu	72
3. 2. 4. Pozitif Seleksiyon Yoluyla MACS İle CD11c ⁺ DH' nin Purifikasyonu	72-73
3. 2. 5. Flow Sitometri İle CD11c ⁺ DH' nin Analizi	73
3. 2. 6. Deney Ortamının Hazırlanması	73
3. 2. 6. 1. DH kültürü ile <i>Candida</i> türlerinin inkübasyonu	73-74
3. 2. 7. Deney grupları	74-75
3. 2. 8. Kontaminasyona Karşı Koruma	76
3. 2. 9. ELISA	76-77
3. 2. 10. PCR	77
3. 2. 10. 1. Hücrelerden mRNA Eldesi	77-78
3. 2. 10. 2. Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) İle cDNA Eldesi	79-80
3. 2. 10. 3. cDNA İzolasyonunun Kontrolü	80
3. 2. 10. 4. TLR (TLR2, 4, 6) ve Kemokin (CCR5, CXCR4, CX3CR1) PCR	80-81

3. 2. 10. 5. RT-PCR İle Ürün Saptanması	82-84
3. 2. 10. 6. Real-Time PCR (SYBR Green I) ile TLR ve Kemokin Reseptörlerinin İfadelenmesinin Saptanması	85-87
3. 2. 10. 7. İstatistiksel Analiz	87

4. BULGULAR

4. 1. DH Analizi	88
4. 2. DH Kültürlerinde DNA Varlığının Doğrulanması	88
4. 2. a. DH Kültürlerinde DNA Varlığının Doğrulanması	88
4. 2. b. cDNA İzolasyonunun Doğrulanması	88-89
4. 3. DH Kültürlerinde TLR ve Kemokin İfadelenmesinin RT-PCR Sonuçları	90
4. 3. a. TLR2 İfadesinin Gösterilmesi	90-91
4. 3. b. TLR4 İfadesinin Gösterilmesi	91-92
4. 3. c. TLR6 İfadesinin Gösterilmesi	93-94
4. 3. d. CCR5 İfadesinin Gösterilmesi	94-95
4. 3. e. CXCR4 İfadesinin Gösterilmesi	96-97
4. 3. f. CX3CR1 İfadesinin Gösterilmesi	97-98
4. 4. DH Kültürlerinde TLR ve Kemokin İfadelenmesinin Real Time-PCR Sonuçları	99
4. 4. a. TLR2 İfadelenmesi	99
4. 4. b. TLR4 İfadelenmesi	100
4. 4. c. TLR6 İfadelenmesi	101
4. 4. d. CCR5 İfadelenmesi	102
4. 4. e. CXCR4 İfadelenmesi	103
4. 4. f. CX3CR1 İfadelenmesi	104
4. 5. DH Kültürlerinde TLR ve Kemokin Üretimi ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi	105
4. 5. a. TLR2 üretimi	105-106

4. 5. b. TLR4 üretimi	107-108
4. 5. c. TLR6 üretimi	109-110
4. 5. d. CCR5 üretimi	111-112
4. 5. e. CXCR4 üretimi	113-114
4. 5. f. CX3CR1 üretimi	115-116
5. TARTIŞMA	117-135
6. SONUÇ	136
7. ÖZET	137-138
8. SUMMARY	139-140
9. KAYNAKÇA	141-157
10. ÖZGEÇMİŞ	158-161

TABLÖLER

Tablo 1: TLR' ler, bağlayıcıları ve yerleşim yerleri	24
Tablo 2: Kemokinler ve reseptörleri	33-35
Tablo 3: Kemokinlerin biyolojik fonksiyonlarına göre sınıflandırılmaları	40-41
Tablo 4: DH kültürü içeren kuyucukların dağılımı	75
Tablo 5: Birinci primer bağlanma miski	79
Tablo 6: cDNA sentezi için miks	79
Tablo 7: TLR ve kemokin RT-PCR Çalışmasında Kullanılan Primerler	81
Tablo 8: PCR Reaksiyon Karışımı	83
Tablo 9: cDNA Çoğaltılması İçin Yapılan PCR Sıcaklık Döngüleri	84
Tablo 10: SYBR Green için hazırlanan PCR reaksiyon karışımı	86
Tablo 11: Real-time PCR (SYBR Green) Sıcaklık Döngüleri	87
Tablo 12: cDNA ng/ml değerleri	89

ŞEKİLLER

Şekil 1: <i>Candida</i> 'nın Hücre Duvar Yapısı ve Katmanları	7
Şekil 2: TLR sinyal yolları	16
Şekil 3: TLR'lerin görevleri ve yer aldığı biyolojik olaylar	18
Şekil 4: TLR yapısı ve ligandları	20
Şekil 5: TLR sinyal kompleksi	22
Şekil 6: TLR'nin mikroorganizmaları tanınması	23
Şekil 7: TLR sinyalizasyonu	26
Şekil 8: Kemokin reseptörleri	36
Şekil 9: Kemokinlerin molekül yapılarına göre sınıflandırılmaları	38
Şekil 10: İmmün yanıtta kemokinlerin rolü	42
Şekil 11: CCR5 reseptörü	45
Şekil 12: Dendritik hücrelerin olgunlaşması	48
Şekil 13: PCR Yönteminin Aşamaları	53
Şekil 14: ELISA yöntemi	63
Şekil 15: Bazı kontrol ve enfekte DH'lerde β -aktin	88
Şekil 16: <i>C. albicans</i> ve <i>C. krusei</i> ile enfekte DH'lerde TLR2 pozitifliği	90
Şekil 17: Kontrol kuyucuklarında TLR2 ifadelenmesi	91
Şekil 18: <i>C. albicans</i> ve <i>C. krusei</i> ile enfekte DH'lerde TLR4 pozitifliği	92
Şekil 19: Kontrol kuyucuklarında TLR4 ifadelenmesi	92

Şekil 20: <i>C. albicans</i> ve <i>C. krusei</i> ile enfekte DH' lerde TLR6 pozitifliği	93
Şekil 21: Kontrol kuyucuklarında TLR6 ifadenmesi	94
Şekil 22: Enfekte DH' lerde CCR5 ifadenmesi	95
Şekil 23: Kontrol grubunda CCR5 ifadenmesi	95
Şekil 24: <i>C. albicans</i> ve <i>C. krusei</i> ile enfekte DH' lerde CXCR4 ifadenmesi	96
Şekil 25: Kontrol kuyucuklarında CXCR4 ifadenmesi	97
Şekil 26: <i>C. albicans</i> ve <i>C. krusei</i> ile enfekte DH' lerde CX3CR1 ifadenmesi	98
Şekil 27: Kontrol kuyucuklarında CX3CR1 ifadenmesi	98
Şekil 28: TLR2 ifadenmesinin Real-time PCR ile gösterilmesi	99
Şekil 29: TLR4 ifadenmesinin Real-time PCR ile gösterilmesi	100
Şekil 30: TLR6 ifadenmesinin Real-time PCR ile gösterilmesi	101
Şekil 31: CCR5 ifadenmesinin Real-time PCR ile gösterilmesi	102
Şekil 32: CXCR4 ifadenmesinin Real-time PCR ile gösterilmesi	103
Şekil 33: CX3CR1 ifadenmesinin Real-time PCR ile gösterilmesi	104

GRAFİKLER

Grafik 1: <i>C. albicans</i> ve <i>C. krusei</i> ile inkübe edilen DH' lerdeki TLR2 üretimi	106
Grafik 2: <i>C. albicans</i> ve <i>C. krusei</i> ile inkübe edilen DH' lerden TLR4 üretimi	108
Grafik 3: <i>C. albicans</i> ve <i>C. krusei</i> ile inkübe edilen DH' lerden TLR6 üretimi	110
Grafik 4: <i>C. albicans</i> ve <i>C. krusei</i> ile inkübe edilen DH' lerden CCR5 üretimi	112
Grafik 5: <i>C. albicans</i> ve <i>C. krusei</i> ile inkübe edilen DH' lerden CXCR4 üretimi	114
Grafik 6: <i>C. albicans</i> ve <i>C. krusei</i> ile inkübe edilen DH' lerden CX3CR1 üretimi	116

1. GİRİŞ

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin daha yaygın kullanımı, tedavi protokollerindeki gelişmeler sonucu bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların yaşam sürelerinin uzaması, organ nakillerinin çok daha sık yapılması ve bu tür hastalarda bağışıklık sistemini baskılayıcı ajanların kullanımının artışı gibi nedenlerle mantar enfeksiyonlarında son yıllarda büyük bir artış görülmektedir ^{1,2,3}.

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

Normal flora elemanı olarak deri, mukoza ve sindirim sisteminde bulunan *Candida* türleri insanda fırsatçı enfeksiyonların en önemli nedenlerindendir ^{1,2,3}.

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

Doğal bağışıklık; bir patojenle karşılaşınca ilk cevabı, doğumdan itibaren oluşturabilen ve konağın kendisine ait olan ve olmayan antijenik yapıyı tanıma kapasitesine sahip savunma sistemidir. Kazanılmış immün sistemin, antijen tanıma kapasitesi çok geniş bir reseptör repertuarıyla spesifisiteyi sağlarken, doğal immün sistem patojenlerde ortak olan bir dizi

moleküler yapıyı tanıyabilmekte ve böylece konağa ait olan ve olmayanı belirleyerek savunmayı başlatabilmektedir. Patojenler üzerinde bu evrimsel olarak korunmuş moleküler yapılara **“patojenle ilişkili moleküler kalıplar (pathogen-associated molecular pattern) (PAMP)”** denilmektedir. Doğal immün sistem hücreleri üzerinde bunları tanıyan reseptörlere de **“kalıp tanıma reseptörleri (Pattern Recognition Receptor) (PRR)”** adı verilmektedir. Bu reseptörler, endositik, sekrete edilen ve sinyal ileten olmak üzere 3 gruba ayrılır. Sinyal ileten reseptör grubunu TLR ailesi oluşturmaktadır. TLR’ ler, mikrobiyal ajanlar tarafından üretilen PAMP’ ları tanırlar ve proinflamatuvar sitokinler (TNF- α ve IL-6 gibi) ve regülatör sitokinlerin (IL-12, IL-18 gibi) ekspresyonu başlatılır. Böylece doğal immün sistem enfeksiyonlara karşı duyarlılıkta merkezi rol alırken aynı zamanda da kazanılmış immün yanıtın yönlendirilmesine yardımcı olur ^{6,7}.

İnflamasyonda ve enfeksiyonlara karşı konakçı cevabında lökositlerin dokulara yerleşimi önemli bir basamağı teşkil etmektedir. Bu süreç kemotaktik sitokinler olarak bilinen kemokinler tarafından kontrol edilmektedir. Kemokinler, inflamasyonda ve homeostazda lökositlere ve kök hücrelere kemotaksi yaptıran sitokinlerdir. Kemokinler, heparin bağlayan proteinlerdir ve lökosit migrasyonunu düzenlemekte, bunun yanında anjiyogenez ve lökosit degranülasyonu gibi süreçlerin de gerçekleşmesine yardımcı olmaktadır. Kemokinlerin organizmada gerçekleşen birçok biyolojik süreçte önemli rolleri bulunmaktadır. Kemokinler, lökosit-endotelial hücre ilişkilerinde, T ve B hücre matürasyonunda, immün denetim, tolerans ve immünitenin oluşumunda, T-B hücre iletişimde ve primer immün cevabın oluşmasında etkin olmaktadır.

Fungal etkenlerin çok sayıdaki tanınma bölgelerinin immün sistem tarafından algılanıp işlenmeye başlaması çeşitli reseptörlerin fonksiyonlarını yerine getirmeleri ile başlamaktadır. Fungal

enfeksiyonlarda PAMP-PRR ilişkisinin ilk adımlarından biri TLR' ler aracılığı ile tamamlanır. Çeşitli bileşenleri nedeniyle TLR' ler ile tanınan fungal ajanlar işlenmek üzere diğer hücrelere yönlendirilir ya da immün sistemin diğer ajanları devreye girer. Bu görev dağılımı sırasında kemokinler de immün sistemin aracı molekülleri arasında yer almaktadır. Kemokinler, fagosit edilen ya da tanınan fungal etkenin immün hücreler aracılığıyla işlenmesinde, diğer hücrelerin uyarılmasında ve etkenin ortadan kaldırılmasında aktif olarak görev alırlar.

Son yıllarda hücresel elamanların ve reseptörlerin gösterilmesi için serolojik yöntemler yanında moleküler yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır. Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile gen ifadesinin gösterilmesi duyarlı ve özgül bir yöntem olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, *Candida* enfeksiyonlarının invitro dendritik hücre kültüründe Toll-like reseptörler (TLR2, 4, 6) ile kemokinlerin (CX3CR1, CXCR4, CCR5) ifadelenmesi üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2. a. Tarihçe

Candida' ya ait ilk bilgiler Hippocrates' e kadar uzanır. M. Ö. 4. yüzyılda aft ve pamukçuğu tanımlayarak bu lezyonların altta yatan ciddi hastalıklar ile ilişkili klinik bir belirti olduğunu tanımlamıştır. 1665' e Galen ile devam eden pamukçuk tanımlamaları geçiş yollarının aydınlatılması ile devam etmiştir. 1839' da Almanya' da Bernard Langenbeck, tifüslü bir hastanın oral lezyonlarından izole ettiği organizmayı "Typhus-Leichen" (tifüs cisimcikleri) olarak tanımlamış, 1841' de Emil Berg tarafından sağlıklı bebeklerde pamukçuğun fungal etyolojisi araştırılmıştır. *Candida albicans* ilk kez 1842' de Gruby tarafından tanımlanmıştır ¹.

2. b. Taksonomi

Candida; *Mycetae* aleminin *Amastigomycota* bölümüne, *Deuteromycetes* sınıfına, *Blastomyces* alt sınıfına ait *Cryptococcaceae* ailesinin *Candida* cinsinde sınıflandırılmıştır ^{8,9}.

2. c. Ekoloji

Candida' lar maya şeklinde üreyen mantarların önemli bir grubudur ve 200' den fazla türü tanımlanmıştır. Bitkilerde de yaşayabilen *Candida* türleri, insan ve diğer sıcakkanlı hayvanların birçoğunda kommensal olarak bulunur. Geçiş yolu genellikle yiyecekler, direk temas (giyecekler, yatak, diş fırçaları vd.) olarak bilinmektedir ^{1,8,9,10}. Bazı türler insan

florasının bir parçası olabilir ancak tüm bu türlerin sadece % 10' u insanlarda enfeksiyon etkeni olma özelliğine sahiptir. *Candida*' lar ağız boşluğu, sindirim kanalı, vajina, rektal bölge, bazı cilt bölgeleri gibi sağlıklı vücut yüzeylerinden izole edilebilir. *Candida albicans* (*C. albicans*), *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii* insanlarda yaygın olarak karşılaşılan türlerdir. *C. albicans*, bu türler arasında en sık izole edilen türdür^{8,9,10}.

2. d. Mikrobiyolojik Özellikleri

Büyüklüğü 2-6 µm arasında olan *Candida*, tek hücreli, ökaryotik ve kemoheterotrof olup, yuvarlak veya oval biçimdedir. Genellikle tek başına, zincirler oluşturarak ya da küçük yumuşak kümeler şeklinde görünür. Aseksüel yolla tomurcuklanarak (blastokonidya) çoğalma gösterir. Birçok tür, dokuya invaze olduğunda hem yalancı hem de gerçek hif formlarını oluşturur (dimorfizm). Arka arkaya tomurcuklanan blastokonidyaların birbirinden ayrılmayıp uzayarak ve aralarında boğumlar oluşturarak yaptıkları hücre zincirleri yalancı hifleri oluşturur. *C. glabrata* hariç tümü uygun koşullar altında yalancı hif üretir^{8,10}.

Candida türleri, antibiyotikli (kloramfenikol veya gentamisin içeren) Sabouraud dextrose agar (SDA)' da pH 4-7' de, 24-42°C' de, 24-48 saatte üretilir. Ayrıca kanlı agar, beyin-kalp infüzyon agar ve triptoz agar gibi bakteriyolojik ortamlarda da üreyebilir. Genellikle kirli beyaz veya krem rengi, nemli, düzgün veya buruşuk kenarlı, düzgün yüzeyli veya göbekli; uzayan inkübasyonla birlikte kıvrımlı hale gelen, mat ya da parlak, maya kokulu yumuşak koloniler oluştururlar. Besiyeri yüzeyinin altında ise yalancı hifler bulunur^{2,3,8}.

Tüm *Candida* türleri glukozu fermente eder, hiçbirisi nitratı asimile edemez. *Candida* türleri genellikle üreaz üretmez ve KNO₃' ü kullanmaz,

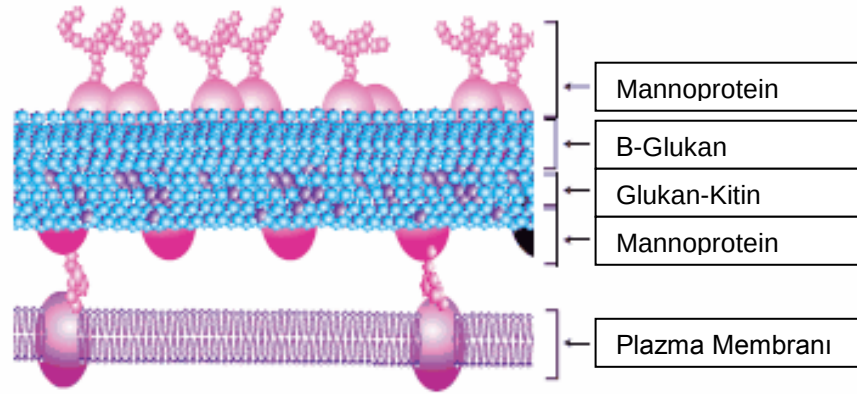
ancak bazı *C. krusei* izolatları üreaz pozitif olabilir. Bu gruptaki maya benzeri mantarların kültürlerinde etanol, asetoin ve asetik asit, formik asit, laktik asit, propionik asit, piruvik asit, süksinik asit gibi organik asitlerden zengin metabolik son ürünler oluşur^{11,12}.

C. albicans iki morfolojik test ile diğer *Candida* türlerinden ayırt edilebilir: Serum içinde 37°C' de 2 saat inkübe edilirse, çimlenme borusu (germ tüp) oluşumu gözlenir. Mısırunu - Tween 80 agarda ise *C. albicans* tipik olarak iri, küre şeklinde klamidospore oluştururlar. Diğer mayalar da olduğu gibi gram pozitif boyanır; hematoksilen veya giemsa boyalarını çok iyi içine almazlar^{2,3}.

2. e. Hücre Yapısı

Hücre duvarı sert bir yapıda olup, hücreye şekil verir, hif oluşumunda görev alır, protoplastı osmotik değişikliklere karşı korur, ortam ile maya arasındaki ilişkiyi düzenler ve maya hücresinin değişik yüzeylere tutunmasında doğrudan görev alır. Duvar yapısında bulunan bazı maddeler antifungal ajanlar için hedef oluştururken, bazıları aynı zamanda antijenik determinantları taşır. Duvar komponentlerinin %80-90' ı karbonhidratlar, % 5-15' i protein ve % 2-5' i lipidlerden oluşur. Karbonhidratların ise % 20-30' u mannoprotein, % 50-60' ı β -glukanlar ve % 0.6-9' u kitin yapısındadır. Polisakkarit olarak mannan, glukan ve kitin içerir. Hücre duvar matriksinin başlıca polisakkaritlerinden olan glukan, β -1,3 dalları içeren β -1,6 D-glukoz rezidülerinden meydana gelir. Ayrıca kitin sentetaz ile sitozolde bulunan kitin, β -1,4 bağları içeren N-asetil-D-glukozaminin dallanmamış polimeridir. β -glukan ve kitin sert bir ağ oluşturarak duvarın yapısal bileşenini oluşturur. Proteinler ve glukoproteinler bu iskelete bağlanır. Mannan ise, α -1,6 bağları olan D-mannozdan oluşur. *C. albicans'* in maya ve hif formlarında glukan ve

mannan içeriği benzerdir fakat hif hücrelerinde kitin miktarı maya hücresine göre 3 kat daha fazladır. Elektron mikroskopisi çalışmalarına göre *Candida*' ların hücre duvarı en az 5 katmanlıdır. Maya-hif dönüşümü süresince bu sayı ve kalınlık değişir. Ayrıca ortamda yüksek yoğunlukta şeker varlığında en dıştaki mannoprotein kalınlaşır ve fibriler oluşumlar artar. Hücre duvarı, şekil değişikliğinden birinci derece sorumludur ^{2,8,12,13}.



Şekil 1: *Candida*' nın Hücre Duvar Yapısı ve Katmanları

2. f. Virulans Faktörleri

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

Altta yatan bir hastalık (lösemi, AIDS vd.), fagositik fonksiyon bozuklukları (granülositopeni, nütropeni vd.), dış etkenler (intravenöz ilaç kullanımı, geniş spektrumlu antibiyotiklerle tedavi, transplantasyon tedavisi, travma vd.) gibi faktörler hastalığın oluşumunu etkiler ^{1,3}.

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

2. f. 1. Aderans (Yapışma)

Aderans, mayanın konak ile ilişkisinde ilk basamağını oluşturur ve hücrelerin yüzey özellikleri ile ilgilidir. *C. albicans*' ı bu cins içerisinde en sık hastalık yapan tür olarak öne çıkaran özelliklerin başında mukoza yüzeylerine yapışma yeteneği gelir. *C. albicans* diğer *Candida* türlerine oranla kan damarları, endotel hücreleri, epidermal keratinositler gibi konak hücrelerine daha fazla yapışma yeteneğine sahiptir ^{1,14}. *C. albicans*' ın konak dokularına invazyonu ve disseminasyonunda; öncelikle konak hücre ve dokularındaki çeşitli proteinlere bağlanması gerekmektedir. Maya hücresinin konak hücre yüzeyine tutunmasında, konağın hormonal ve immünolojik koşullarının yanı sıra mantarın yüzey özelliklerinin de önemi vardır. Çeşitli yüzeylere bağlanmasını; şekerler, metal iyonları, pH, ısı gibi çevresel faktörlerin yanı sıra fibrinojen, fibronektin, laminin, tip I ve tip IV kollojen gibi konak proteinleri ve maya hücrelerinin morfolojileri, üreme fazları, yüzey özellikleri, diğer mikroorganizmalar ile etkileşimleri belirlemektedir ^{1,3,14}.

2. f. 2. Morfolojik Değişim

C. albicans ve *Candida dubliniensis* için morfogenez tek hücreli maya formundan hif ve yalancı hif olarak adlandırılan filamantöz formlara geçişin tanımıdır. Bu geçiş, N-asetil glukozamin, serum, bazı aminoasitler ve biyotin varlığında ve de nötral pH, 37°C-40°C, % 5.5 CO₂ varlığı gibi çevresel koşullarda kolaylaşır. Hifal formdan maya forma dönüş ise daha düşük ısılarda, asidik pH' da, serum yokluğunda ve yüksek konsantrasyonda glukoz varlığında gerçekleşir. Mayadan hifal forma dönüşümde, pek çok genin düzenliyiçi rol aldığı bilinmektedir.

Enfekte dokularda *C. albicans*' ın hem maya hem de miçel şekli bulunsa da, hif şeklinin maya şekline göre dokuya daha fazla yapışması, fagositler tarafından sindirilememesi, aktif semptomlu enfeksiyonla ilişkili olması, plastik yüzeylere yapışmayı sağlayan fibriler yüzey tabakaları oluşturması, çimlenmekte olan hücrelerin daha virulan olması, hifin patogenezi ve virulansdaki rolünü kanıtlayan bulgulardır ^{1,9,10,14}.

2. f. 3. Fenotipik Değişim

C. albicans kolonileri düzgün, halka, yıldız, çizgili, şapka, buruşuk, tüylü gibi morfolojik değişimler gösterirler. Bu dönüşüm, stres altında iken kendiliğinden gelişir ve hücre yüzeyi özelliklerinde ve kolonilerin görüntülerinde ve de metabolik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerinde değişiklikler ortaya çıkar; tüm bu değişimler enfeksiyon sürecinde daha virulan ve etkin olmak üzere düzenlenmektedir.

C. albicans' daki fenotipik dönüşüm, çeşitli fenotipik ve metabolik parametreleri ve SAP geni regülasyonu gibi bir seri virulans özelliklerini de etkiler. Fenotipik dönüşüm, mayanın konaktaki çevresel koşullara uyumunu kolaylaştırır.

Maya-hif geçişinden farklı olarak, fenotipik dnşm sürecinde, aynı çevresel koşullar altında aynı popülasyondaki bazı hücreler birbirinden değişik fenotipler sergilerler. Kolonilerdeki fenotipik dönüşüm, 10^2 - 10^3 gibi yüksek sıklıkta ortaya çıkmaktadır. Bu sürecin moleküler temeli henüz tam aydınlatılamamıştır. En iyi çalışılmış olan dönüşüm, kolonilerdeki WO-1 (White-opaque) (beyaz-opak) fenotipidir. Bu süreçte beyaz, oval ve düzgün koloniler, gri ve buruşuk kolonilere dnşmektedir^{8,15}.

2. f. 4. Toksinler ve Enzimler

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

Hücre dışı enzimlerden olan salgısal aspartil proteinaz (SAP), adezyon ve invazyonda etkilidir. Hidrolize ettikleri konak proteinleri; kolla-jen, laminin, fibronektin, musin, laktoferrin, α 2-makroglobulin, immünoglobulinler, IL-1 β , kompleman, albumin ve pıhtılaşma faktörleri ncleridir^{9,10,13}.

Fosfolipazlar, insan hücre membranında bulunan gliserofosfolipidlerin ester bağlarını hidrolize ederler ve epitel hücrelerine tutunmada ve invazyonda önemli role sahiptirler. Özellikle kandan izole edilen kökenlerin çoğunda fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır^{14,15,16}.

2. f. 5. Biyofilm Oluşumu

Biyofilm, mikrop topluluklarının dış polimerik polimerik matriks tarafından çevrelendiği; su kanallarına benzer kanalların yer aldığı ve bir yüzeye tutunmuş halde organize bir oluşumdur.

Sistemik *Candida* enfeksiyonları sıklıkla kateter, yapay eklem ve protez kalp kapağı gibi medikal aletlerin varlığı ile ilişkilidir. Bu aletlerin üzerine yapışıp biyofilm üretimi ile kolonizasyon oluşturan *Candida* türlerinde virulans derecesi ve biyofilm oluşturma yeteneği arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Ayrıca tıbbi malzemelerin üzerine yapışabilmesi ve biyofilm oluşturabilmesi kandidemi oluşumu ve antifungal direnç riskini artırmaktadır ^{1,14,15,17}.

Kateterde ortaya çıkan biyofilmlerde hem maya hem de konağa ait faktörlerin rol aldığı; bu yapışma ve kolonizasyon için mantarın slime faktörünün, konağın da fibrin ve fibronektinlerinin gerekli olduğu bildirilmektedir. Biyofilmlerdeki hücrelerin ana hücrelerden tamamen farklı fenotipik özellik gösterdiği, klinikte kullanılan antifungallere de ana hücrelere oranla daha dirençli olduğu bildirilmiştir ^{17,18}.

2. g. *Candida* Enfeksiyonları ve Patogenez

C. albicans ağız boşluğu, sindirim kanalı, genital sistem florasının üyesi olan bir mikroorganizmadır. Mayanın çoğalması; fiziki bariyerler, endojen flora ile rekabet ile konak savunma mekanizmaları sayesinde baskılanmaktadır. Konağın bağışıklık sistemindeki baskılanma ya da doğal bariyerlerinin bozulması halinde kolonize olan *C. albicans* endojen kaynaklı fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Ayrıca santral venöz beslenme ve hastane çalışanları yolu ile ekzojen kaynaklı enfeksiyonlarda meydana gelebilmektedir ^{1,8,9}.

Candida enfeksiyonları primer olarak kutanöz, mukokütanöz (yüzeyel) ve sistemik (derin) olmak üzere 3 gruba ayrılır. Yüzeyel kandidozlar deri ve mukozaların, derin kandidozlar ise iç organ ve sistemlerin enfeksiyonlarıdır.

2. g. 1. İmmunopatogeneze

Vücuda giren patojenler, immün sistemin birbiriyle bağlantılı iki yolu tarafından karşılanmaktadır. Bunlar, doğal ve kazanılmış immünitedir. Bu iki sistem, birbiriyle çok hassas bir denge içerisinde ve birbiri ile bağlantılı çalışarak konağı patojenlere karşı korumaktadır.

Doğal immünite, bir patojenle karşılaşınca ilk cevabı doğumdan itibaren oluşturabilen ve konağın kendisine ait olan ve olmayan antijenik yapıyı tanıma kapasitesine sahip olan savunma sistemidir. Kazanılmış immün sistem, spesifik ve antijenle tekrarlayan karşılaşmalarda daha hızlı ve güçlü cevap oluşturma gibi üstünlüklere sahiptir. Kazanılmış immün yanıt, sekonder lenfoid organlardan yöneltilir; daha yavaş gelişir, uzun sürelidir ve antijene özgüdür. Kazanılmış immün yanıtta, antijen B ve T hücrelerin yüzeyinde bulunan özel reseptörler yardımıyla tanınır ve işlenir^{4,5,8,18}.

Doğal immün sistem, hücreleri ve çeşitli molekülleri içerir. Doğal yanıt hücreleri periferde bulunur ve hızlı yanıt oluştururlar. Antijene özgül olmayan bu yanıt sitokin salgıları, kompleman aktivasyonu, fagositoz ve yüzey savunma mekanizmalarından ibarettir. Doğal bağışıklığın hücresel elemanları; polimorfonükleer lökosit, monosit, makrofaj, dendritik hücreler, eozinofil, mast hücre ve bazofiller, çözünür faktörler ise sitokinler, akut faz reaktanları ve kompleman sisteminden oluşur.

Kazanılmış immünite tarafından yabancı antijenin tanınmasından sorumlu majör mekanizmaların çoğu açıklığa kavuşturulmasına rağmen, mikroorganizmaların doğal immün sistem tarafından tanınma mekanizması uzun süreden beri gizli kalmıştır^{4,5,19,20,21}.

Doğal bağışıklık; bir patojenle karşılaşınca ilk cevabı, doğumdan itibaren oluşturabilen ve konağın kendisine ait olan ve olmayan antijenik yapıyı tanıma kapasitesine sahip savunma sistemidir. Organizmanın enfeksiyonlarla mücadelesinde hem evrimsel olarak eski hem de oldukça

evrensel olan doğal immün sistem, spesifik immüniteyle kıyaslandığında patojenleri tanıyan reseptörler açısından daha kısıtlı bir repertuara sahiptir. Kazanılmış immün sistemin, antijen tanıma kapasitesi çok geniş bir reseptör repertuarıyla spesifisiteyi sağlarken, doğal immün sistem patojenlerde ortak olan bir dizi moleküler yapıyı tanıyabilmekte ve böylece konağa ait olan ve olmayanı belirleyerek savunmayı başlatabilmektedir. Patojenler üzerinde bu evrimsel olarak korunmuş moleküler yapılara **“patojenle ilişkili moleküler kalıplar (pathogen-associated molecular pattern (PAMP))”** denilmektedir. Doğal immün sistem hücreleri üzerinde bunları tanıyan reseptörlere de **“kalıp tanıma reseptörü (Pathogen Recognition Receptor (PRR))”** adı verilmektedir. Bu reseptörler, endositik, sekrete edilen ve sinyal ileten olmak üzere 3 gruba ayrılır. Sinyal ileten reseptör grubunu TLR ailesi oluşturmaktadır. TLR’ ler, mikrobiyal ajanlar tarafından üretilen PAMP’ ları tanırlar ve proinflamatuvar sitokinler (TNF- α ve IL-6 gibi) ve regülatör sitokinlerin (IL-12, IL-18 gibi) ekspresyonu başlatılır. Böylece doğal immün sistem enfeksiyonlara karşı duyarlılıkta merkezi rol alırken aynı zamanda da kazanılmış immün yanıtın yönlendirilmesine yardımcı olur^{6,7,8,19,20,21}.

Aslında PRR’ ler patojen ile kommensal mikroorganizmaları birbirinden ayıramaz. TLR’ ler çok sayıda mikroorganizmayı tespit etme yeteneğinde olup doğal immünitede kritik rol oynamaktadır. Buna rağmen, diğer PRR’ ler belirli patojenleri tanıyabilme özelliğindedir^{22,23}. Hepimiz kommensal mikroflora ile temas halinde olduğumuz için bunlar tarafından enflamatuvar yanıtların devamlı aktivasyonu konak için ölümcül olaylara sebep olabilir. Ancak bu, normal fizyolojik durumlarda meydana gelmez. Konağın patojen olmayan mikroorganizmalara toleran kalmasını sağlayan asıl mekanizma hala tam olarak bilinmemektedir.

PRR’ lerin başlıca fonksiyonları: opsonizasyon, kompleman ve koagülasyon kaskadlarının aktivasyonu, fagositoz, proinflamatuvar sinyal yollarının aktivasyonu ve apoptozun induksiyonu olarak özetlenebilir²⁰.

2. g. 1. 1. Toll-like reseptörler (TLR)

İlk kez *Drosophila* türünde, embriyonal gelişim basamaklarında rol aldığı bilinen bir reseptör olarak tanımlanan ve daha sonra mutant olan sineklerde fungal enfeksiyonlara yatkınlık olduğu fark edilerek, immün sistem cevabında önemli fonksiyonu olduğu düşünülen reseptöre “**Toll**” adı verilmiştir. *Drosophila* kazanılmış immün mekanizmalara sahip olmamasına rağmen mikropların invazyonuna karşı antimikrobiyal peptitleri sentezleyerek etkin bir konak savunma yanıtı gösterir. “Toll” Almanca “müthiş, harika”, Türkçe kelime anlamı olarak “yol köprü” gibi yerlerden paralı geçişlerde ödenen ücrettir. İnsan TLR’ si ekstraselüler ve intraselüler özellikleriyle sinek TLR’ sinin homologudur. 1997 yılında insan homologu tariflenmiş ve şaşırtıcı bir şekilde doğal immün sistemin parçası olduğu görülmüştür ^{22,23,24,25}.

TLR patojene spesifik immün yanıt oluşmasını sağlar, bu özellik genetik olarak belirlenir. TLR’ lerin keşfi, konak-patojen etkileşimi, hücresel ve humoral yanıtların uyarılma ve oluşma mekanizmalarının anlaşılmasına yardımcı olmuştur. TLR’ lerin patojenlere ait çeşitli komponentlerin tanınmasında ve bunu takiben kazanılmış immün yanıtların gelişmesine yol açan doğal immünitinin aktivasyonunda önemli roller oynadığını gösteren kanıtlar her geçen gün artmaktadır ^{20,22,26,27}.

2. g. 1. 1. a. TLR’ lerinin Yapısı ve İletim Mekanizmaları

Birçok bilimsel buluşta olduğu gibi TLR’ lerin keşfinden sonra konak- mikroorganizma ilişkisine bakış açısı yenilenmiştir. “Mikroplar konağı nasıl etkiler ?” ya da “bir enfeksiyon etkeni konak tarafından nasıl algılanır?” sorularına yanıt TLR keşfi ile yanıt bulmuştur ²⁸. TLR’ ler mikrobiyal ürünlerin primer sensörleri gibi davranır, immün ve inflamatuvar genlerin sentezini başlatacak mekanizmaları devreye sokar ve kazanılmış cevapları etkilerler ^{6,27}.

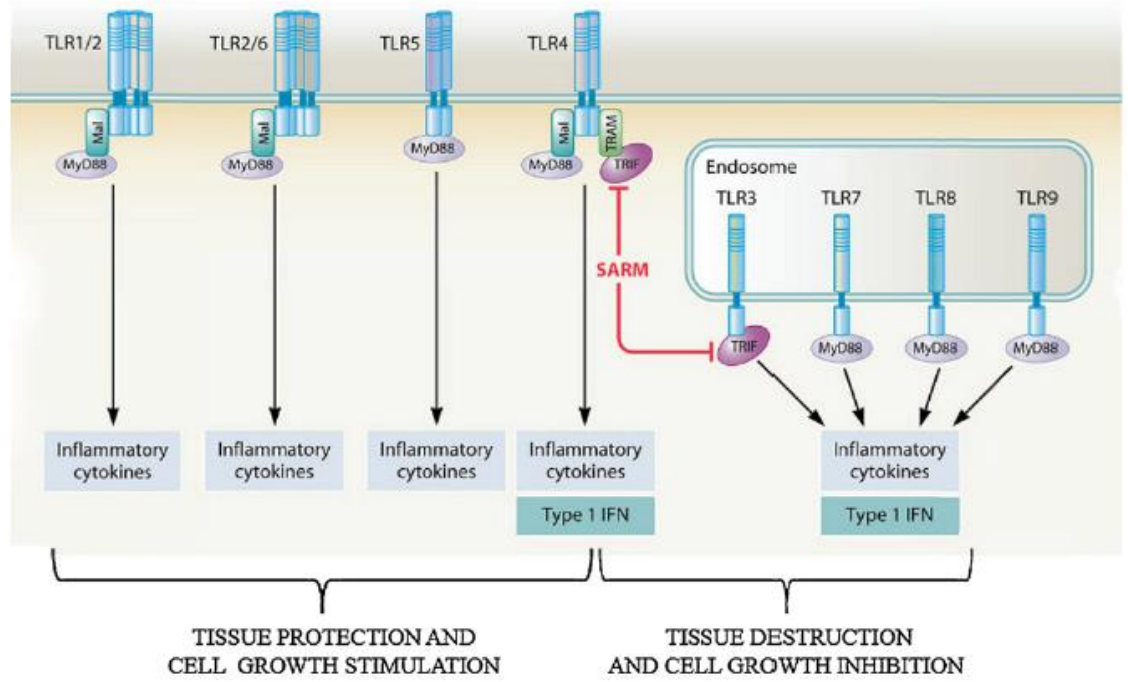
Bir grup PRR olan ve patojen tanınmasında, inflamatuvar ve immün sistem cevabının başlatılmasında oldukça önemli bir role sahip olan TLR, sitoplazmik ve ekstraselüler bölgeden oluşan bir transmembran proteindir. Karakteristik olarak ekstraselüler lösinden zengin tekrar bölgeleri (LRR) ve intraselüler toll/interlökin (IL)-1 reseptör (TIR) domaininden oluşur ^{22,29}.

IL-1R' nin sitoplazmik porsiyonu ile Drosophila Toll'unun sitoplazmik porsiyonu birbirine benzerlik gösterir. Bu alana **TIR (Toll/Interlökin-1 reseptör) alanı** denir. Bu domain, hücre içi sinyal iletiminde görevlidir. Toll ailesinin bütün üyeleri transmembran proteinleridir. Ekstraselüler alanlarında ise **lösinden zengin tekrarlara** (leucine-rich repeats, LRR) sahiptirler. TLR' ler, sitoplazmik bölgelerinde yaklaşık 200 aminoasitten oluşan ve IL-1R ile benzer TIR alanına sahiptir. Toll ailesi proteinlerinin ekstraselüler kısmı geniş (550-980 aminoasit) olup birden çok bağlayıcı (ligand) alana sahiptir. Aynı zamanda bu ekstraselüler alan, sistinden zengin küçük alanları da içerir. LRR' ler, 20-29 aminoasitlik kısa protein modülleridir. LRR bölgeleri tekrarlayan glikozillenmiş yapılarıyla TLR' ler arasında farklılık gösterirler. Bu farklılıklara dayanılarak TLR arasında sınıflandırma sağlanır. LRR bölgelerinin farklı patojenlerin tanınmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir ^{22,23,29,30}.

Her TLR mikroorganizmalara karşı biyolojik cevabı indükleyen sinyal yolağına sahiptir. TLR' ler ile mikrobiyal komponentlerin tanınması, dendritik hücre maturasyonu ve sitokin üretimini indükleyen sinyal yolaklarının aktivasyonu ile başlatılır, kazanılmış immün yanıtın gelişimi ile tamamlanır. TLR' ler mikrobiyal ajanlar tarafından üretilen PAMP' ları tanırlar ^{23,24}.

TIR aktivasyonu IL-1 aracılığıyla inflamatuvar ve immün cevabın aktivasyonuna, sitokin, sitokin reseptörleri, büyüme faktörleri, akut faz proteinleri ve adezyon molekül genlerinin oluşmasına neden olmaktadır. TLR, sitoplazma içi TIR domaini aracılığıyla ile PAMP ile bağlanınca aktive olur ve intraselüler kısmı aracılığıyla nuklear faktör-kappa beta (NF-kB) NF-kB ve mitojenle aktive edilen protein kinaz ailelerini uyarır. Bunun

sonucu olarak NF- κ B, TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi sitokin ve proinflatuvar ürünlerin genlerini aktive eder. Bu süreç konağın doğal immün cevabıdır. Memelilerde, TIR domaini inflamatuvar yanıtın oluşumunu sağlayan MyD88 (myeloid differentiation antigen 88) ve TIRAP (TIR domain containing protein) denen sinyal adaptörlerinin sitoplazmik proteinlerinde de vardır. TLR' ler bu proteinlere bağlanarak hücre içi iletimin başlatılması sağlanır^{24,26,27,31,32} (Şekil 2).



Şekil 2: TLR sinyal yolları³²

TLR' ler NF- κ B yolağını tetikleyip, MyD88, TIRAP, IRAK (IL-1 receptor associated kinase) ve TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) gibi aracı moleküller sayesinde IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF gibi sitokin ve kemokin salınımını sağlarlar ve CD80, CD86 ve CD40 gibi moleküllerin yapımını arttırırlar.

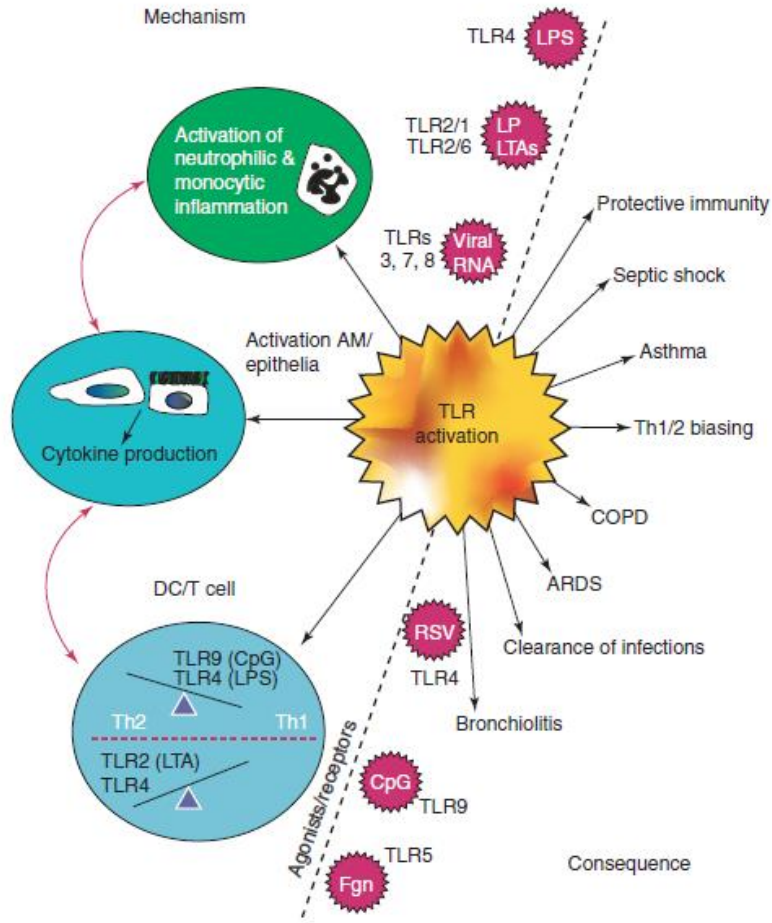
Bunlara ek olarak dendritik hücrelerin matürasyonu ve antijen sunum kapasitesindeki artış neticesinde, doğal immün sistem kazanılmış immün sistemi bir tehlikeye işaret edencesine işaret ederek yönlendirmektedir^{6,7,22,29,33,34}.

2. g. 1. 1. b. TLR ve Efektör Yanıt

Patojenik antijenler doğal ve kazanılmış immün yanıtı stimüle ederler. PAMP-TLR aktivasyonu konakta makrofaj, dendritik hücre, mast hücresi, monosit, nötrofil, interlökinler, TNF- α ve akut faz proteinleri gibi proinflamatuvar sitokinler aracılığıyla çok hızlı (dakikalar/saatler) bir doğal immün yanıt oluşumuna neden olurken gecikmiş kazanılmış yanıt oluşumuna (7-10 gün) neden olur^{22,35,36}.

İlginç olarak, TLR aktivasyonu, IL-10 gibi bazı sitokinlerin salınımını baskılayabilir. Böylece, aynı PAMP cevabı olarak oluşturulan TLR aracılı pro ve anti-inflamatuvar sitokin ekspresyonları dengelenmektedir. Bazı bakteriyel lipoproteinler de TLR2 yoluyla monositlerde apoptozu indüklemeye yeteneğine sahiptir. Böylece doğal immün yanıtın dokuda oluşturacağı hasardan korunulmuş olur³⁵.

Her TLR, spesifik yapıları tanıma özelliğine sahiptir ve genel inflamatuvar sitokinlerin (Tip 1 IFN gibi) salınımı indükler. TLR' ler ayrıca T ve B hücrelerin aktivasyonu, otoimmün mekanizmaların indüklenmesi, çeşitli sitokinlerin salınması gibi özelliklere de sahiptirler (Şekil 3).



Şekil 3: TLR'lerin görevleri ve yer aldığı biyolojik olaylar ³⁷

2. g. 1. 1. c. Toll-like Reseptör Ailesi Üyeleri

Bugüne kadar TLR ailesinde ortak sekans benzerlikleri göz önünde bulundurularak 13 üye saptanmıştır. Bunlardan TLR1-TLR9 arası ve TLR11' in ligandları belirlenmiş; TLR10' un ligandı ise henüz bilinmemektedir. TLR2 ve TLR4' ün çok sayıda ligandı tanımlanmıştır ^{6,29} (Şekil 4).

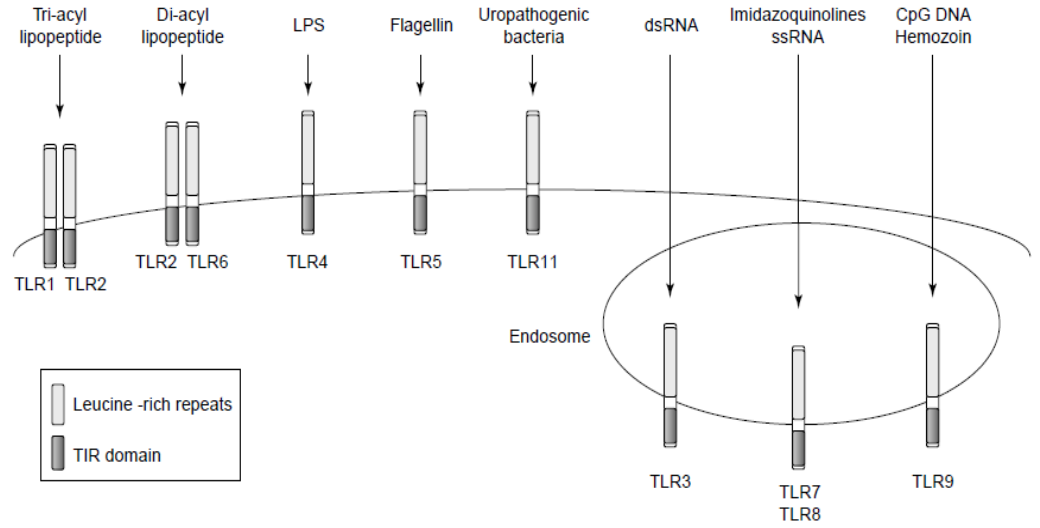
İlk tanımlanan TLR1 olmasına rağmen, bu reseptörlerden fonksiyonu ilk belirlenen TLR4 olmuştur. Ancak her bir TLR' nin ligand

spesifisitesi farklıdır. TLR' ler ligandlarına dayanarak 2 kategoride sınıflandırılabilir. TLR1, 2, 4 ve 6' yı içeren grup lipidleri tanırken, TLR3, 7, 8 ve 9' u tanıyan grup nükleik asitleri tanıma özelliğine sahiptir ^{25,29}.

TLR' ler hem lenfoid hem de nonlenfoid dokuda eksprese olmaktadır. Northern blot analizi ve mRNA ekspresyonuna bakılarak, TLR1' in ağırlıklı olarak monosit, nötrofil, B- hücreleri ve natural killer (NK) hücrelerinde, TLR2' nin monosit, nötrofil ve dendritik hücrelerde, TLR3' ün dendritik hücrelerde, TLR4' ün endotelyal hücreler, monosit, nötrofil ve dendritik hücrelerde, TLR5' in ise monosit ve dendritik hücrelerde eksprese olduğu gösterilmiştir. Ancak tüm bu veriler mRNA ekspresyonu esasına dayandığı için, fonksiyonel proteininin kesin olarak varlığını gösterdiğini söylemek mümkün değildir. Ayrıca, mRNA ekspresyonu, hücre içinde mi yoksa hücre yüzeyinde mi bulunduğu ayrımını yapamamaktadır. Kısıtlı sayıda TLR antikoru bulunduğu için yüzey ekspresyonları hakkındaki bilgiler yeterli değildir ^{6,7,29,33}.

TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 tipleri hücre yüzeyinde; TLR3, 7, 8, 9 sitoplazmada özellikle endozomlarda bulunur.

İnsan tlr genlerinin, kromozom 4p14 (TLR1), 4q32 (TLR2), 4q35 (TLR3), 9q32-33 (TLR4), 1q33.3 (TLR5), 4p16.1 (TLR6), Xp22.3 (TLR7), Xp22 (TLR8) ve 3p21.3 (TLR9) üzerinde olduğu gösterilmiştir ^{7,33}.



Şekil 4: TLR yapısı ve ligandları ³⁶

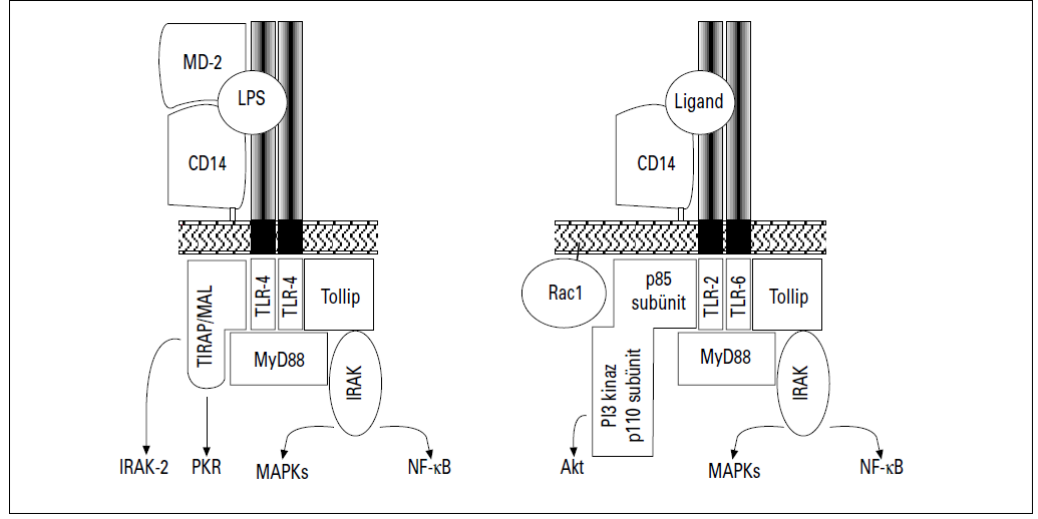
2. g. 1. 1. c. 1. TLR2

Hem gram (-) hem de gram (+) bakteriler üzerinde bulunan lipoproteinlerin TLR2 tarafından tanınması sonucunda hücreleri aktive ettiği gösterilmiş ve TLR2' nin ağırlıklı olarak lipoproteinleri tanıyan reseptör olduğu kabul edilmiştir. TLR2, peptidoglikan, lipoteikoik asit, lipopolisakkarit ile bağlanarak cevap verebilmektedir. TLR2' nin ligandları tanınması ve sinyal iletimi oluşturabilmesi için diğer TLR' ler ile dimerize olması gerekmektedir. Peptidoglikan, TLR2 ve TLR6' nın dimer oluşturduğu reseptör aracılığıyla sinyal iletirken, lipoproteinler TLR6' ya ihtiyaç duymadan TLR2' yi aktive edebilmektedir. Buna ek olarak, TLR2, TLR1 ile kompleks oluşturabilme özelliğindedir. Gram (-) ve gram (+) bakterilerin lipoproteinleri tek başına TLR2 ile tanınmaktadır ^{38,39,40}.

2. g. 1. 1. c. 2. TLR4

İnsanda en çok araştırılan ve fonksiyonu aydınlatılan TLR'lerden olan TLR4, lipopolisakkaritlerin (LPS) tanınmasında rol almaktadır. TLR4'ün bir LPS reseptörü olduğu ortaya çıkarılmış ve bu reseptörün fonksiyonel olarak hücre yüzeyinde; CD14, MD2 (TLR4 ektodomainine sıkıca bağlanmış küçük bir protein) ve LPS bağlayıcı proteini içeren bir molekül kompleksini oluşturduğu, bu moleküllerden herhangi birinin eksik olduğu farelerde LPS cevabının da eksik olduğu gözlenmiştir ³⁸ (Şekil 5). İzleyen değerlendirmelerde, gram negatif bakterilerin oluşturduğu ağır enfeksiyonlarla TLR4 mutasyonlarının birlikteliği dikkat çekmiştir. CD14, TLR4'ü ve ekstraselüler aksesuar bir protein olan MD-2'yi içeren bir kompleksle birleşmektedir. TLR4'ün LPS dışında konağa ait olan ve olmayan birçok molekülü tanıyabildiği bilinmektedir. Bu reseptörler aktive olduğu zaman IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler salınmaktadır. TLR4 geni eksik farelerde LPS'ye cevabın azalmış olduğu tespit edilmiştir ⁴¹.

TLR4'ün LPS dışında, konağa ait olan veya olmayan birçok molekülü tanıyabildiği bilinmektedir ⁴². Hem endojen hem de mikrobiyal kaynaklı "Heat-Shock Protein 60 (HSP60)" ın da TLR-4'ün tanınması sonucunda inflamatuvar sinyal oluşturduğu gösterilmiştir. TLR4 ayrıca mantarlarda bulunan mannan, protozoonlardaki glikoinostolfosfolipidleri de tanıma özeliğindedir ²⁹.

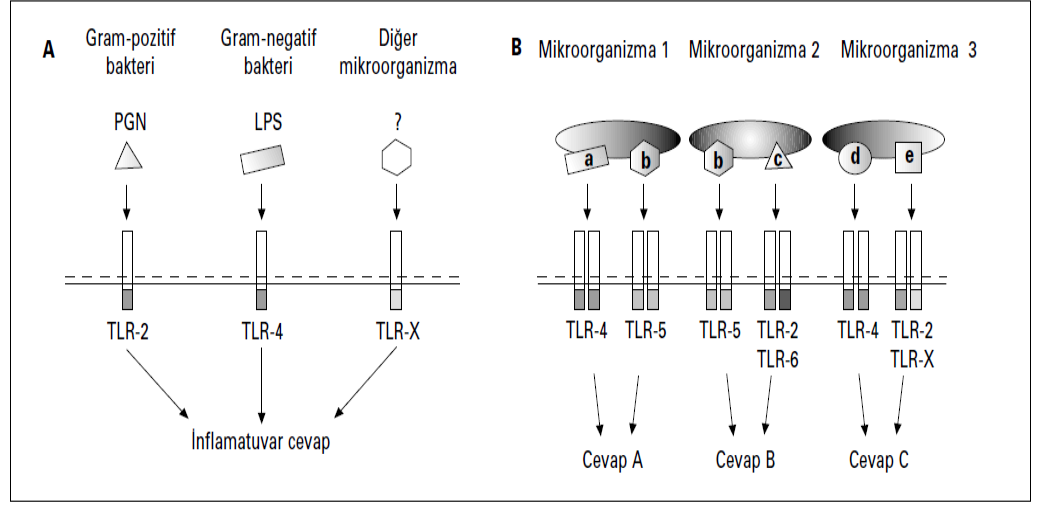


Şekil 5: TLR sinyal kompleksi ³³

2. g. 1. 1. c. 3. TLR6

TLR6, TLR2 ile heterodimerdir. TLR6' dan yoksun makrofajlar mikoplazmal lipopeptite (MALP-2) karşı cevap oluşturamazken, sentetik bakteri lipopeptidine (BLP) karşı normal sitokin üretilmesini gösterirler. TLR2' den yoksun fareler ise MALP-2' ye de BLP' ye de cevap veremezler.

TLR2 ve TLR6, MALP-2' yi tanımda beraber rol oynarken; TLR6, MALP-2 ve BLP arasındaki küçük yapısal farklılığın tanınmasından da sorumludur ⁴³ (Şekil 6).



Şekil 6: TLR' nin mikroorganizmaları tanınması ⁴⁶

2. g. 1. 1. d. TLR' lerin Ligandları (Bağlayıcıları)

TLR' ler özelliklerinden dolayı kolayca değişmezler. Bu reseptörler, tehditlerle ilişkilendirilen molekülleri tanırlar ve yüksek oranda spesifite gösterirler. Bu gerekliliğe uyan patojenle ilişkili moleküller, genellikle patojenin görevinde kritik öneme sahiptir ve mutasyonlarla değiştirilemez ya da elimine olamazlar. Bu özellikleriyle evrimden korunmuş sayılırlar. Patojenlerde iyi korunan bu özellikler, bakterilerde hücre yüzeyi LPS, lipoprotein, lipopeptit ve lipoarabinomannan, bakteriyel flagelladan flagellin gibi proteinler; virüslerin çift zincirli RNA' sı ya da bakterilerin metillenmemiş CpG adaları ve viral DNA' sı ile diğer DNA ve RNA' larıdır ^{33,46} (Tablo1).

Tablo 1: TLR' ler, bağlayıcıları ve yerleşim yerleri

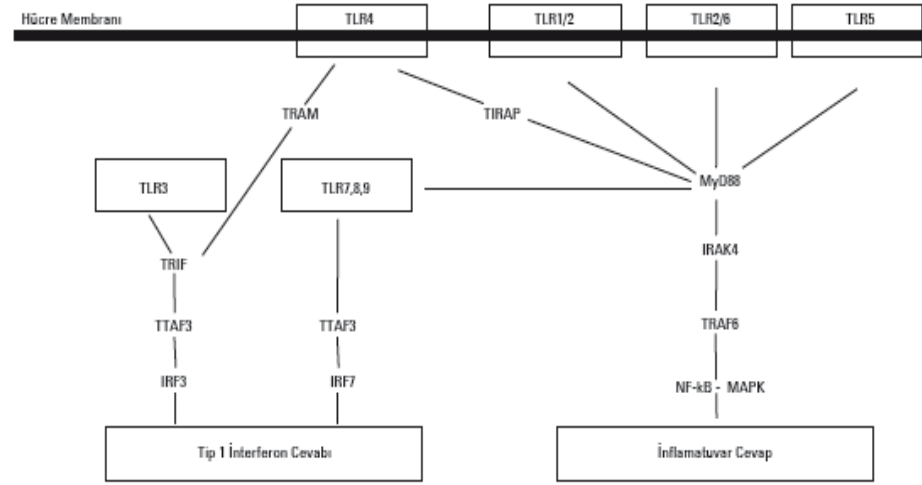
Reseptör	Ligandı	Adaptörü	Yerleşim yeri
TLR1	Triaçil lipoproteinler, solubl faktörler, peptidoglikan	MyD88/MAL	Hücre yüzeyi
TLR2	Lipoproteinler, gram pozitif peptidoglikan, lipoteik asitler, hyaluronik asit, ısı şok proteinleri, mantar (Zymosan ve fosfolipomannan), glikoinozitolfosfolipidler, viral glikoproteinler (hemaglutinin)	MyD88/MAL	Hücre yüzeyi
TLR3	Çift zincirli RNA, LPS	TRIF	Hücre kompartımanı
TLR4	Lipopolisakkarit, ısı şok proteinleri, hyaluronik asit, heparan sülfat, fibronektin, fibrinojen, viral glikoproteinler (füzyon ve zarf proteinleri), mannan, glukuronoksilomannan	MyD88/ MAL/TRIF/ TRAM	Hücre yüzeyi
TLR5	Flagellin	MyD88	Hücre yüzeyi
TLR6	Diaçil lipoproteinler	MyD88/MAL	Hücre yüzeyi
TLR7	Küçük sentetik birleşimler (imidazoquinolin, loxoribin), tek zincirli RNA	MyD88	Hücre kompartımanı
TLR8	Küçük sentetik birleşimler, tek zincirli RNA	MyD88	Hücre kompartımanı
TLR9	Metillenmemiş CpG DNA	MyD88	Hücre kompartımanı
TLR10	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Hücre yüzeyi
TLR11	Profilin	MyD88	Hücre yüzeyi
TLR12	Bilinmiyor	Bilinmiyor	?
TLR13	Bilinmiyor	Bilinmiyor	?

2. g. 1. 1. e. TLR Sinyal Yolu

TLR; MyD88 bağımlı ve MyD88 bağımsız sinyal yolu olmak üzere iki yoldan oluşmaktadır. Bu sinyal yollarında başlıca dört adaptör molekül rol oynar: MyD88, TIR bölgesi IFN-beta indükleyen adaptör proteini (TRIF), TRIF ile ilişkili adaptör molekül (TRAM) ve TIR ilişkili protein (TIRAP). MyD88, TLR3 dışındaki tüm TLR tiplerinde, TLR aracılığı ile oluşan doğal immün yanıtın aktivasyonu için başlıca elemandır. Ligandın bağlanması ile uyarılan TLR' nin TIR bölgesi MyD88 ile birleşir. Bu birleşmeyle uyarılan IL-1R ilişkili kinaz 4 (IRAK 4) ve tümör nekrozis faktör reseptör ilişkili faktör 6 (TRAF 6) aracılığıyla NFkB, mitojenle ilişkili protein kinazı (MAPK) aktive eder ve inflamatuvar cevaba neden olur ⁴⁴.

MyD88 bağımsız sinyal yolu ise başlıca TLR3 ve 4 tarafından kullanılmaktadır. Bu sinyal yolunda TLR3, TRIF üzerinden TRAF ve IRF3' ü uyararak tip 1 interferon cevabına neden olur iken, TLR4 TRAM üzerinden TRIF' ı uyararak bu cevaba neden olur ⁴⁵.

Ayrıca TLR7, 8 ve 9' un TRAF3 ve IRF7 üzerinden tip 1 interferon cevabı geliştirdiği gösterilmiştir. MyD88 ve TIRAP proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10), TRIF ve TRAM ise interferonların yapımından sorumludur ^{44,45} (Şekil 7).



Şekil 7: TLR sinyalizasyonu ⁴⁶

MyD88 bağımlı sinyal yolunda; MyD88 önemli rol oynayıp bu molekül TLR' nin sitoplazmik kuyruğuyla birleşir ve uç bölgesi IRAK-1 (IL-1R ilişkili kinaz) ile homofilik etkileşimde bulunarak bu molekülü reseptöre bağlar. MyD88 bağımsız/TRIF bağımlı sinyal yol, IFN (interferon)-β' yı indüklemek için TLR3 ve TLR4 aracılı sinyal yollarını kullanır ³³.

2. g. 1. 1. f. TLR' lerin İmmün Yanıtı Etkileri

TLR' ler, mikrobiyal ürünlerin primer sensörleri gibi davranır, immün ve inflamatuvar genlerin sentezini başlatacak mekanizmaları devreye girer.

TLR aktivasyonu, T ve B lenfositlerden oluşan kazanılmış immün yanıtı başlatır. TLR, liganda bağlanınca aktive olur ve intraselüler kısmı aracılığı ile NF-kB ve mitojenle aktive edilen protein kinaz ailelerini uyarır. NF-kB; TNF-α, IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi sitokin ve proinflamatuvar ürünlerin genlerini aktive eder. Bu süreç konağın doğal immün cevabıdır ³³. Pattern tanıyıcı reseptörleri ile patojendeki "patojen ilişkili moleküler patternleri

tanıyan, PAMP” dendritik hücreler, olgunlaşır ve periferden lenf yumrularına taşınarak T hücelere antijen sunarlar. Böylece T ve B hücrelerin aktivasyon sürecinde rol alırlar. TLR, dendritik hücrelerin T hücrelerini daha etkin bir şekilde uyarmasını sağlayan ko-stimulan molekülün de seviyelerini artırır, hücre ürünlerinin (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-18) üretimini ve salınmasını düzenler ⁴⁴. Bu olaylar sırasında T hücrelerin hangi tip yanıt oluşturacağını belirleyen dominant sitokin profili, mikrobiyal enfeksiyonların temizlenmesinde kritik roldedir.

TLR’nin dominant T hücre tipini sitokinler aracılığıyla düzenlediği düşünülmektedir. Sitokinlerle düzenlenen en önemli yol ayrımı, T hücrelerinin Th1 ya da Th2 yönünde farklılaşmasıdır. TLR ile uyarılan dendritik hücreler, IL-12 ile IL-18 salgılar ve Th1 hücrelerin gelişmesini sağlar. IL-10 ve IL-4 fazla salındığında ise Th2 immün yanıtı gelişir. B hücreleri uyarılır ve antikör sentezi başlar. Bakteriyel lipopolisakkaritlerin yüksek dozları Th1 ve düşük dozları Th2 cevabının gelişmesini sağlar. Bu nedenle lipopolisakkaritleri tanıyan TLR4, Th1 ve Th2 dengesinde kritik roldedir ^{8,26,34}.

TLR ilişkili NF-kB’ nin aktivasyonu ile salınan enzimler, sitokinler ve mediatörler konağın antimikrobiyal savunmasını uyarır ve inflamatuvar olayları tetikler. Bu süreç patojeni ortadan kaldırılmasını sağlar. İnflamatuvar reaksiyon sınırlandırılmazsa, konak hücrelerinin harabiyetine neden olabilir ^{45,46}.

TLR aktivasyonu, patojenlerin konak hücrelerinin fagositozu için gereklidir. TLR, patojenlerin fagositozunu uyarır, fagozom içeriğine karşı gelişen inflamatuvar yanıtı güçlendirir ve fagozomun olgunlaşmasına yardımcı olur. Böylelikle fagosite edilmiş bakterinin öldürülmesi kolaylaşır.

TLR aktivasyonu apopitoza da neden olabilir. Lipopolisakkaritlerin ya da lipoproteinlerin TLR4 ve TLR2/6 üzerinden apopitozu uyatabildikleri gösterilmiştir. TLR⁺ enfekte hücrelerin apopitoza uğraması, konağın enfeksiyonu ortadan kaldırmasına yardımcı olabilir.

Bellek T hücreleri üzerinde bulunan TLR2, aynı ajanla tekrar maruz kalındığında immün sistemin daha erken ve hızlı uyarılmasını sağlar. Otoimmün hastalıklarda mikrobiyal enfeksiyonların ataklara neden olması aynı mekanizmayla olmaktadır ^{45,46}.

Memelilerde, doğal immünitinin aktivasyonunu, spesifik T ve B lenfosit uyarımı ile karakterize kazanılmış immünitinin aktivasyonu izler. Kazanılmış immünitinin aktivasyonu için bilgiler çoğunlukla dendritik hücrelerle sağlanmıştır. Periferdeki immatur DH' ler antijen alımında uygun olan endositoz için yüksek kapasiteye sahiptir. İmmatur DH' ler mikrobiyal komponentler tarafından aktive edilir ve olgunlaşır. Olgun DH' ler endositoz kapasitesini kaybeder, lenf noduna göç eder ve burada naif T lenfositleri ile etkileşip kazanılmış immün yanıtı başlatır. TLR1, 2 ve 5' in ekspresyonu immatur DH' lerde gözlenir fakat DH' ler olgunlaştığında azalır. TLR3 ise yalnızca olgun DH' lerde eksprese edilir ⁴⁷. Ek olarak LPS, CpG DNA, lipoprotein ve mikobakterilerin hücre duvar iskeleti gibi çeşitli bakteriyel komponentlerin TLR aracılığıyla DH' lerin maturasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Bu bulgulardan hareket edilerek, TLR' lerin DH' lerin maturasyonunda kritik yer aldığı ve kazanılmış immünitinin aktivasyonunu başlattığı söylenebilir. Bununla beraber, TLR' lerin kazanılmış immünitedeki rollerini tamamen anlamak için hala bazı sorulara yanıt bulunması gerekmektedir ²⁷.

TLR' leri aktive eden mikrobiyal komponentlerin tümü DH' ler tarafından IL-12 yapımını indükler ve Th1 hücrelerin gelişmesine yol açar ^{34,49}. Doğal immünitinin Th1 ve Th2 gelişimi arasındaki dengeyi nasıl düzenlediği hala açıklanamamıştır.

TLR' lerin, hücrelerin mikrobiyal ürünlere cevaben gelişen biyolojik adaptasyonlarında görevli ve DH performansını arttıran inflamatuvar araçlar oldukları gösterilmiştir. TLR' lerin sadece sitokin ve kostimulatör molekül transkripsiyonunu tetiklemedikleri, ayrıca membran vakuoler sistemini, hücre iskeletini, protein translasyon ve degradasyon mekanizmalarını da etkiledikleri gösterilmiştir.

2. g. 1. 1. g. TLR' ler Aracılığı ile Mikrobiyal Tanıma

Bakteriyel ve fungal tanımayı sağlayan TLR' ler (TLR1, 2, 4, 5 ve 6) hücre yüzeyinde eksprese edilirken, viral ve bakteriyel nükleik asitleri tanımada görevli TLR' ler (TLR3, 7, 8 ve 9) hücre içi yerleşim gösterirler⁴⁸.

2. g. 1. 1. g. 1. Fungal Tanınma

TLR' ler *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. neoformans* gibi mantarları tanıma özelliğine sahiptir. Mantarların hücre duvarında ya da hücre yüzeyinde bulunan çok sayıda komponent sayesinde TLR' ler için potansiyel ligand olma özelliğindedir. Mantar hücre membranında bulunan zimosan, glukon, mannan, proteinler, kitin ve glikolipitlerin TLR2' yi aktive ettiği gösterilmiştir. TLR2' nin ayrıca *C. albicans*' ın hücre yüzeyinde yer alan fosfolipomannanı, TLR4' ün de mannan, glukuroksilomannanın tanıdığı belirlenmiştir^{6,23,36,48}. Bu tanıma işlemi, birçok reseptörün aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Fungal enfeksiyonların temizlenmesinde önemli olan Th1 yanıtı TLR4 aktivitesinin başlamasına aracılık eder. TLR4 defektli farelerde yaygın *C. albicans* enfeksiyonuna karşı duyarlılığın arttığı görülmüştür. Diğer taraftan, TLR2, TLR4' e oranla daha az Th1 yanıtı ile oluşan inflamatuvar sitokinleri indüklediği ve buna bağlı olarak IL-10 üretiminin arttığı, Th2 yanıtının aktivasyonu ile immün cevabın baskılandığı da belirlenmiştir. TLR2 defektli farelerin fungal enfeksiyonlara karşı daha dirençli olduğu görülmüştür. Bu farelerde normal inflamatuvar sitokin üretimi görülürken, artan IL-10 sekresyonunun *C. albicans*' a karşı direnci geliştirdiği düşünülmektedir^{19,21,48}.

Fırsatçı patojen olan *A. fumigatus*' un da benzer immün mekanizmaları kullandığı belirlenmiştir. İnfektif olmayan konidyaların TLR2 ve TLR4 ile tanıdığı, daha virülen olan hiflerin ise TLR2 ile tanınarak IL-10 ve Th2 immün yanıtını artırdığı görülmüştür^{36,48}.

2. h. Kemokinler

İnflamasyonda ve enfeksiyonlara karşı konakçı cevabında lökositlerin dokulara yerleşimi önemli bir basamağı teşkil etmektedir. Bu süreç **kemotaktik sitokinler** olarak bilinen kemokinler tarafından kontrol edilmektedir. Kemokinler, inflamasyonda ve homeostazda lökositlere ve kök hücrelere kemotaksi yaptıran sitokinlerdir ^{50,51,58}.

İlk olarak Walz ve ark. tarafından 1977' de antikoagülan kemokin olan CXCL4 tanımlanmıştır.

Kemokinler, heparin bağlayan proteinlerdir ve lökosit migrasyonunu düzenlemekte, bunun yanında anjiyogenez ve lökosit degranülasyonu gibi süreçlerin de gerçekleşmesine yardımcı olmaktadır. Kemokinlerin organizmada gerçekleşen birçok biyolojik süreçte önemli rolleri bulunur. Kemokinler, lökosit-endotelyal hücre ilişkilerinde, T ve B hücre matürasyonunda, immün denetim, tolerans ve immünitinin oluşumunda, T-B hücre iletişimde ve primer immün cevabın oluşmasında etkin olmaktadır. Ayrıca, dendritik hücre fonksiyonlarında, T hücre farklılaşması ve fonksiyonlarının sağlanmasında, efektör T hücre cevabı ve inflamatuvar hastalıklarda, mukozal immünitide ve HIV-1 virüsünü de içeren çeşitli virüsler tarafından konakçı immün cevabı baskılayan olaylarda rol oynar ^{50,51,52,56,58}.

2. h. 1. Kemokinlerin Yapı ve Fonksiyonları

Tüm kemokin reseptörleri membran bağımlı moleküller olup yapılarında 7 transmembran domainleri bulunmaktadır ve G-proteinleri ile çiftler oluşturmaktadır. Kemokin reseptörleri, "**G-protein-coupled protein**" olup lökositler üzerinde ifadenmektedir. Kemokinler, hedef hücreler üzerindeki spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak hücre-içi sinyali başlatırlar ve hücre migrasyonu ile aktivasyonunu indüklemektedir ^{51,52,53,54}.

Kemokinler, inflamatuvar cevap sırasında birçok hücre tarafından üretilmekte ve hücreler arası iletişimin yönlendirilmesinde görev almaktadır. Genellikle birden fazla hücre tipine etkili olurlar, invitro etkileri; kemotaksis, intraselüler depolardan enzim salınımı, oksijen radikallerinin oluşumu, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ile oluşan şekil değişikliği, lipid mediatörlerinin oluşumu, endotel ve ekstraselüler matriks proteinlerine bağlanmanın sağlanması, adezyon molekülleriyle koordineli etkileşimi ile lökositlerin intraselüler alandan ekstraselüler bölgeye geçiş trafiğinin düzenlenmesi, anjiogenez ve sinir hücrelerinin kontrolü olarak sayılabilir ^{52,53,54,58,59}.

Kemokin reseptörleri farklı tipteki lökositler üzerinde eksprese olmaktadır. Bazı reseptörler hücrelere sıkıca bağlıdır (örneğin; CXCR1 esas olarak nötrofillere çok sıkı bağlıdır), buna karşılık diğerleri geniş olarak diğer tüm hücrelerde eksprese olmaktadır (Örneğin; CCR2 monositler, T hücreler, NK hücreler, dendritik hücreler ve bazofiller). Buna ek olarak, CCR1 ve CCR2 gibi kemokin reseptörleri monositler üzerinden eksprese edilmektedir. Fakat bu reseptörlerin lenfositler üzerinden ekspresyonu ancak IL-2 tarafından stimülasyonundan sonra olmaktadır. Ayrıca, bazı yapısal kemokin reseptörleri down-regüle olabilmektedir. CCR2, lipopolisakkaritler tarafından down-regüle olmakta, bunun sonucunda da bu hücreleri MCP-1'e karşı cevapsız bırakmaktadır ve hücreler sadece bu reseptörleri aktive etmektedir ^{51,53,58,59}.

Kemokinler, fonksiyonlarını hücre membranındaki kemokin reseptörlerine bağlanarak ve onları aktive ederek gösterir. Aktivasyon hücre sinyal iletim mekanizmalarından Ca^{+2} metabolik yolunu kullanır. Bu kemokin reseptörleri, 7 transmembran protein süper ailesi içinde yer alan G proteinine bağlı hücre yüzey reseptörleridir. Bu reseptörlerin kemokinlerle uyarılmasıyla hücre içinde gelişen bir dizi enzimatik reaksiyon, Ca^{+2} konsantrasyonunun artışına ve böylece endoplazmik retikulumdan intraselüler mediatörlerin salınmasına ve dolayısıyla hedef proteinin fonksiyonel hale gelmesine sebep olur ^{50,52,54,58,59}.

Kemokin reseptörleri, “G-protein-coupled reseptör” ailesinin diğer üyeleri gibi fonksiyonel olarak fosfolipazlarla G-proteinlerine bağlıdır. Bazı kemokinlerin indüklenmiş sinyal olayları, *Bordetella pertussis* toksini ile inhibe olup kemokin reseptörlerinin G proteinleri ile ilişkisini kanıtlamaktadır^{57,58,59}.

2. h. 2. Kemokin Aileleri

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda insanlarda yaklaşık olarak 50 kadar kemokin ve 19 kemokin reseptörü tanımlanmıştır. Kemokinler, 8-12 kD moleküler ağırlığa sahip multiple domainleri bulunan protein yapısında moleküllerdir. Kemokin genlerinin çoğu lokalize edilmiştir ve bazı istisnalar olmakla birlikte değişik ailelerin genleri belli kromozomlar üzerinde kümelenmeye eğilimlidir. CC kemokin genleri 17q11.2-12 ve CXC kemokin genleri de 4q13 lokusunda bulunur.

Bütün kemokinler yapısal olarak benzer ve monomerik formları küçüktür. Kemokinlerin çoğu solüsyonlarda dimerize olur. Monomerik formlar, kısa bir amino uç (NH₂), en az 3 anti-paralel beta bandı (β -pleated sheet) ve bağlayıcı luplardan oluşan bir iskelet ve karboksi uçta 20-30 aminoasitten oluşan bir alfa heliks yapısı taşır. Kemokinlerin çoğu pozisyonları çok iyi korunmuş olan ve disülfid bağlarıyla bağlı 4 sistein içerir. Lenfotaktin hariç bütün kemokinlerde 2 adet disülfid bağı bulunur. Kemokinler, NH₂ uca en yakın konumdaki sistein (C) çiftinin özelliklerine göre sınıflandırılır^{52,53,57,58}.

Kemokinlerin sınıflandırılmalarında, yapısal ve fonksiyonel olmak üzere 2 majör klasifikasyon sistemi bulunmaktadır. Kemokinler, yapısal olarak içerdikleri sistein (C) rezidülerinin pozisyonuna göre CXC, CC, C, CX3C olmak üzere 4 süper gen ailesine ayrılır (Tablo 2). Ayrıca kemokinler, homeostatik veya inflamatuvar olarak fonksiyonlarına göre sınıflandırılır. Homeostatik kemokinler, hücrelerde ifadelenir ve lenfoid yapının organizasyonunu içeren housekeeping fonksiyonları vardır. Tam

tersine, inflamatuvar kemokinler sitokin aktivasyonu ile indüklenebilir ve genellikle inflamasyon sırasında hücreden salınır^{53,54,58}.

Kemokinler, 8-12 kD yapısındaki heparin bağlayan proteinler olup %20-70 oranında aminoasit dizilerinde homoloji göstermektedir. Kemokinler, yapılarında bulunan sistein rezidülerinin bulunduğu molekülün N-terminal ucundaki yerleşim pozisyonlarına göre 4 gruba ayrılır. Fakat bu gruplardan sadece 2 tanesi detaylı olarak karakterize edilmiştir. Tüm kemokinler; en azından 3 beta tabakası (β 1-3) ve C terminal α heliks yapısı açısından benzerlik gösterir. Alfa (α) ve beta (β) kemokinler, yapılarında 4 sistein içermekte olup kemokinlerin en büyük grubunu oluşturmaktadır^{51,58,59}.

Tablo 2: Kemokinler ve reseptörleri^{57,58}

Sınıf	Sistematik adı	Genel sinonimleri	Reseptör
CXC (α)	CXCL1	GRO α , MGSA, KC (Fare), MIP-2 (Fare)	CXCR2
	CXCL2	GRO β , MIP-2 α	CXCR2
	CXCL3	GRO γ , MIP-2 β	CXCR2
	CXCL4	Platelet factor 4	Bilinmiyor
	CXCL5	ENA-78	CXCR2
	CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2
	CXCL7	PBP, CTAP-III, NAP-2	CXCR2
	CXCL8	IL-8, GCP, LIF, NAP-1	CXCR1, CXCR2
	CXCL9	Mig, CGR-10 (fare)	CXCR3
	CXCL10	IP-10, CGR-2 (fare)	CXCR3
	CXCL11	I-TAC, β - R1, IP9	CXCR3

	CXCL12	SDF-1 α , SDF-1 β , TPAR1	CXCR4
	CXCL13	BCA-1, BLC	CXCR5
	CXCL14	BRAX, Bolekine	Bilinmiyor
	CXCL15		Bilinmiyor
	CXCL16		CXCR6
CC (β)	CCL1	1-309, TCA-3 (fare)	CCR8
	CCL2	MCP-1, MCAF, HC11, JE (fare)	CCR2
	CCL3	MIP-1 α , LD-78 α , PAT464	CCR1, CCR5
	CCL4	MIP-1 β , ACT-2, HC21	CCR5
	CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
	CCL6	C10 (fare), MRP-1 (fare)	Bilinmiyor
	CCL7	MCP-3, NC28, FIC	CCR1, CCR2, CCR3
	CCL8	MCP-2, HC14	CCR3
	CCL9	MRP- 2 (fare), MIP-1 γ (fare)	Bilinmiyor
	CCL10		Bilinmiyor
	CCL11	Eotaxin	CCR3
	CCL12	MCP-5 (fare)	CCR2
	CCL13	MCP-4, NCC-1	CCR2, CCR3
	CCL14	CC-1, HCC-1, NCC-2, CCCK-1	CCR1
	CCL15	HCC-2, Lkn-1, MIP-5, CC-2, NCC-3	CCR1, CCR3
	CCL16	HCC-4, LEC, NCC-4, LMC	CCR1
	CCL17	TARC	CCR4
	CCL18	DC-CK-1, PARC, MIP-4, AMAC-1	Bilinmiyor

	CCL19	MIP-3 β , ELC	CCR7
	CCL20	MIP-3 α , LARC	CCR6
	CCL21	6Ckine, SLC	CCR7
	CCL22	MDC, STCP-1	CCR4
	CCL23	MPIF-1, MIP-3	CCR1
	CCL24	Eotaxin-2, MPIF-2	CCR3
	CCL25	TECK	CCR9
	CCL26	Eotaxin-3, MIP-4 α	CCR3
	CCL27	ESkine, CTACK	CCR10
	CCL28	MEC	CCR10
C (γ)	XCL1	Lenfotaktin α	XCR1
	XCL2	Lenfotaktin β	XCR2
CX3C (δ)	CX3CL1	Fraktalkin	CX3CR1

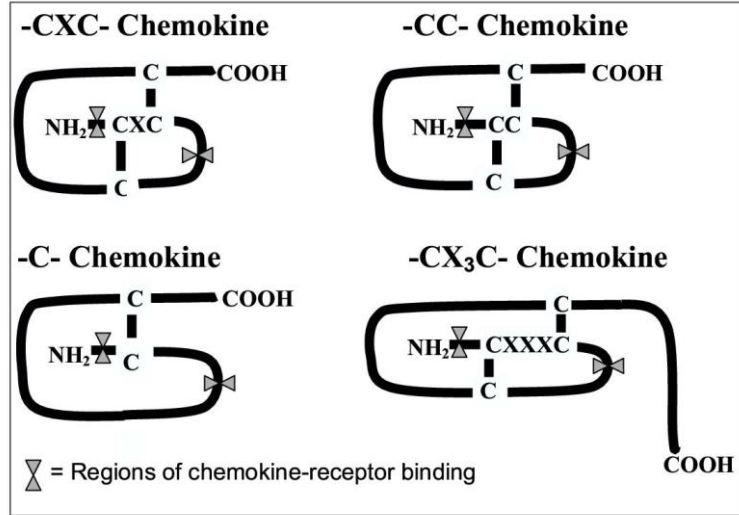
2. h. 2. 2. CC Kemokin Ailesi (β kemokinler)

β -kemokinler, ilk iki sistein rezidüsü birbirleriyle yan yana bulunan kemokinlerdir (Cysteine-Cysteine) ve CC kemokin olarak sınıflandırılır. CXXXC sınıfındaki fraktalkin, membran bağımlı glikoprotein yapısında olup ilk iki sistein rezidüsü üç aminoasitle ayrılmış konumda bulunmaktadır. CC kemokinlerde (β kemokin) α -kemokinlerden farklı olarak N terminaline yakın 2 sisteini ayıran aminoasit yoktur. CC kemokinlerin fonksiyonları bazı farklılıklar gösterirse de başlıca mononükleer hücrelere etkilidir (monosit-makrofaj ve T lenfosit). Bazıları eozinofil ve bazofiller için kuvvetli kemotaktiktir. Bazıları NK ve dendritik hücreleri de (DH) etkiler. Genellikle nötrofiller üzerinde inaktiftir.

CXC kemokinler, inflamasyon sırasında lökosit adezyonu, reorganizasyon, nötrofil degranülasyonu, fagositoz gibi birçok olayda görev alırlar. Yapılarında IL-8/CXCL8, ENA-78 (epitel-nötrofil aktive edici protein-78)/CXCL5, gro α (büyümeyi düzenleyici onkogen α) (growth-regulated oncogene- α) /CXCL1 ve CTAP-III (konnektif doku aktive edici peptit- connetive tissue activating peptide III)/CXCL7 içermektedir^{51,54,59}.

α kemokinler, N-terminal ucuna yakın glutamik asit-lösin-arginin dizilerini içerip içermemelerine göre de alt gruplara ayrılır. α -kemokinler CXC dizilerinde nötrofiller için kemotaktik özelliğe sahip olan glutamik asit-lösin-arginin aminoasit dizilerini taşımaktadır. Buna karşılık, α -kemokinler CXC dizilerinde lenfositler üzerinde rol oynayacak aminoasit dizileri taşımaz. α -kemokinler nötrofillere etki ederken; lenfositlere karşı etki göstermez.

β kemokinler, genel olarak nötrofiller üzerinde etki göstermez. Yapısal olarak β -kemokinler 2 alt gruba ayrılır. Yaklaşık olarak % 65 oranında birbirleriyle ve β -kemokinlerle yapısal olarak benzerlik göstermektedirler. CXC-kemokin ailesi ile birlikte β -kemokinlerin N-terminal aminoasitlerinin CC rezidüleri, kemokinlerin biyolojik aktivitesi ve lökosit seçiciliği için kritik öneme sahip komponentlerdir^{53,57,59} (Şekil 9).



Şekil 9: Kemokinlerin molekül yapılarına göre sınıflandırılmaları

2. h. 2. 3. C Kemokin Ailesi (γ kemokinler)

Bu ailenin bilinen tek elamanı olan lenfotaktin diğer kemokinlerin 2. ve 4. sisteinlerine karşılık gelen 2 sisteine sahiptir ve amino uçta tek bir sistein vardır. Geni 1. kromozomdadır. Başlıca T lenfositler tarafından yapılır ve T lenfositler için kemotaktiktir.

CC kemokinler, daha çok lenfositlerden salınır. Yapılarında MCP-1 (monosit kemoatraktif protein)/CCL2, MIP-1α (makrofaj inflamatuvar protein)/CCL3, MIP-3α/CCL20, RANTES/CCL5 içermektedir^{52,53,57}.

2. h. 2. 4. CX₃C Kemokin Ailesi (δ kemokinler)

Diğer kemokinlerin aksine amino ucunda bir sistein taşıyan hücre yüzey membran proteinidir. Kemokin kısmı yoğun biçimde müesine benzer karbonhidrat taşıyan uzun bir çubuğun sonunda yer alır. Fraktalkinin ilk iki sisteini arasında 3 aminoasit yer alır. Endotel hücre üzerindeki fraktalkin in

vitro monosit ve T lenfosit adezyonunu indükler ve adezyon molekülü gibi davranır. DH olgunlaşması sırasında fraktalkin ekspresyonu artar, doku bütünlüğü, tamiri ve rejenerasyonunda rolü olabilir. CX3C ailesinde fraktalkin/CX3CL1 bulunmaktadır.

Kemokinler, standart sınıflandırılmaları dışında biyolojik fonksiyonlarına göre inflamatuvar, homeostatik ve ikili olmak üzere 3 gruba da ayrılabilir (Tablo 3). İnflamatuvar/indüklenebilir kemokinler, proinflamatuvar sitokinlere ve patojenlere yanıt olarak enfekte dokularda eksprese edilir. İmmün hücreler üzerindeki etkileri nedeniyle doğal ve kazanılmış immün yanıtı yönlendirici etkiye sahiptir. Homeostatik kemokinler ise aksine, lenfositler ve dendritik hücreler üzerine etkiyerek immün yanıtın devamlılığını sağlar. Dual kemokinler ise, immün hücrelerin aktivasyonu ve gelişimleri üzerine etki yaparak immün savunma fonksiyonlarını düzenler^{56,57,58}.

Tablo 3: Kemokinlerin biyolojik fonksiyonlarına göre sınıflandırılmaları ^{54,57}

Kemokinler	Reseptörler	Fonksiyonları
İnflamatuvar		
CXCL6	CXCR1, CXCR2	Doğal immünite
CXCL8	CXCR1, CXCR2	
CXCL1	CXCR2	
CXCL2	CXCR2	
CXCL3	CXCR2	
CXCL5	CXCR2	
CX3CL1	CX3CR1	
CCL2	CCR2	Doğal ve kazanılmış immünite
CCL3	CCR1, CCR5	
CCL5	CCR1, CCR3, CCR5	
CCL7	CCR1, CCR2, CCR3	
CCL8	CCR3	
CCL11	CCR3	
CCL13	CCR2, CCR3	
CCL14	CCR1	
CCL15	CCR1, CCR3	
CCL24	CCR3	
CCL26	CCR3	
CCL27	CCR10	
CCL28	CCR10	
XCL1	XCR1	
XCL2	XCR1	

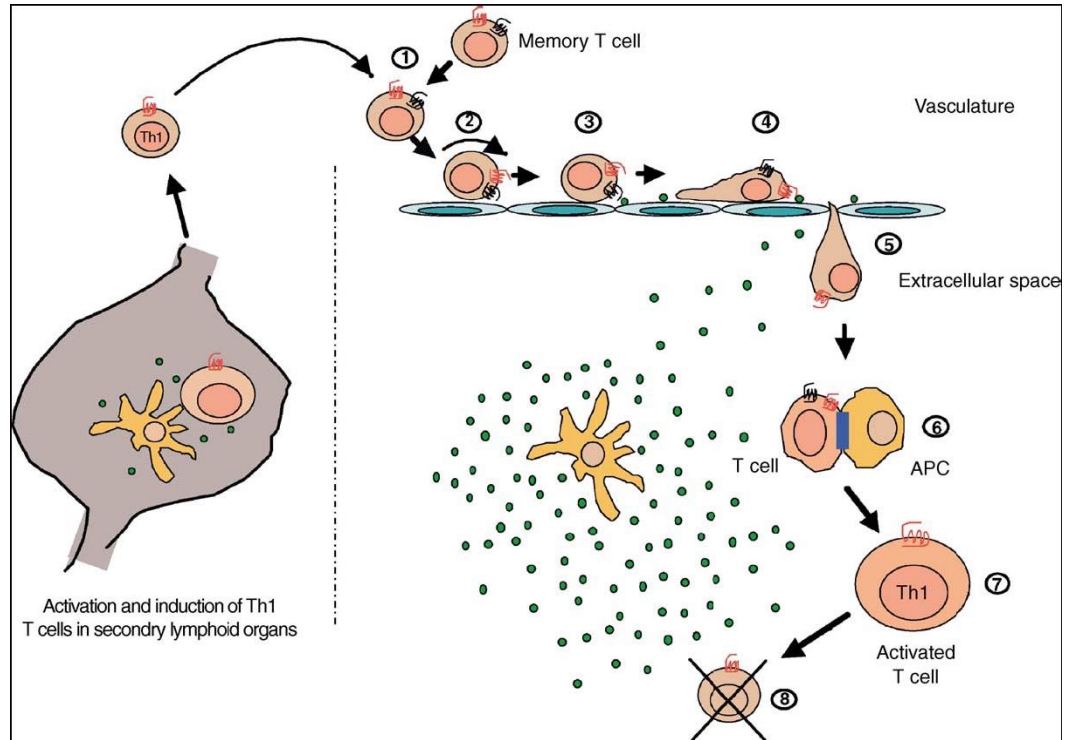
Homeostatik		
CXCL12	CXCR4	Hematopoez
CXCL13	CXCR5	Lökosit homeostazı
CXCL14	Bilinmiyor	ASH gelişimi
CCL18	Bilinmiyor	T hücre- DH etkileşimi
CCL19	CCR7	T lenfopoezi
CCL21	CCR7	Dalak ve lenf nodunda T hücre merkezi
Dual		
CXCL9	CXCR3	T lenfopoezi
CXCL10	CXCR3	Kazanılmış immünite
CXCL11	CXCR3	
CXCL16	CXCR6	T lenfopoezi
CCL1	CCR8	T lenfopoezi, kazanılmış immünite
CCL17	CCR4	T lenfopoezi
CCL20	CCR6	DH gelişimi, kazanılmış immünite
CCL22	CCR4	Kazanılmış immünite
CCL25	CCR9	T lenfopoezi, kazanılmış immünite

2. h. 3. Kemokinlerin Rol Aldığı Olaylar

Kemokin stimülasyonu kemotaksise neden olur. Farklı tiplerdeki lökositlerin kemotaksisi kompleks kemokin reseptör kombinasyonu ile gerçekleşmektedir. İmmün sistemin fizyolojik koşullardaki hücre trafiğini sağlayan homeostatik kemokinler ile inflamasyon sırasında uyarılmış

kemokinler arasında belirgin farklar vardır. Lenfositlerin, monosit ve granülositlerin, aktivasyonun farklı dönemlerindeki farklı migrasyon özellikleri, homeostatik ve uyarılmış kemokinlerin kompleks kombinasyonları aracılığıyla bir düzen kazanır. Kemokinlerin kemotaksis dışında, dendritik hücre matürasyonu, hücre adezyonunu, makrofaj aktivasyonu, fagositoz, nötrofil degranülasyonu, T hücre farklılaşması ve aktivasyonu, B hücre antikör tip belirlenmesi, apoptoz, anjiogenezis, proliferasyon, hematopoez, anti-tümör aktivite, morfogenez, fibrogenez ve sitokin sekresyonu gibi çok sayıda fonksiyonları da vardır^{51,52,58,59}.

Kemokinlerin immün yanıtta fonksiyon basamakları Şekil 10 'da gösterilmektedir.



Şekil 10: İmmün yanıtta kemokinlerin rolü

Kemokin ekspresyonu immün yanıtın devamında da rol oynar. CXCL12 apoptozu tetikleyen bir kemokindir. Kemokin-ilişkili hücre ölümü, inflamatuvar bölgede geç dönemde ortaya çıkan bir düzenleyici mekanizmadır.

2. h. 4. Kemokin Üretimi ve Etkileri

Kemokinler genellikle lokal olarak salınan ve etki eden maddelerdir. Çoğu organda bazal kemokin üretimi düşük olup, mRNA düzeyi, total hücresel RNA düzeyinin %1' ini aştığı durumlarda hızla ortaya çıkar. İskemik, toksik veya inflamatuvar lezyonlarda kemokin sekresyonu belirgin olarak artar. Kemokinler için en önemli uyaranlar şunlardır:

- IL-1 β , TNF
- Lipopolisakkaritler
- Bazı büyüme faktörleri (PDGF: platelet derived growth factor)
- Viral enfeksiyon ajanları
- Bakteriyel ürünler

IFN- α , IL-4, Th-1 ve Th-2 lenfositlerden salgılanan sitokinler belirli bir sıra ile kemokin üretimini arttırırlar, öncelikle IL-1 ve ardından TNF- α hücrelerden kemokin salgılanmasını sağlar. Bunun yanında kemokin üretiminin inhibisyonu; TGF- β (transforming growth factor), IL-4 ve IL-10 gibi sitokinler ile olur; ancak bu etkileşim kemokine ve hücreye göre değişiklik gösterir.

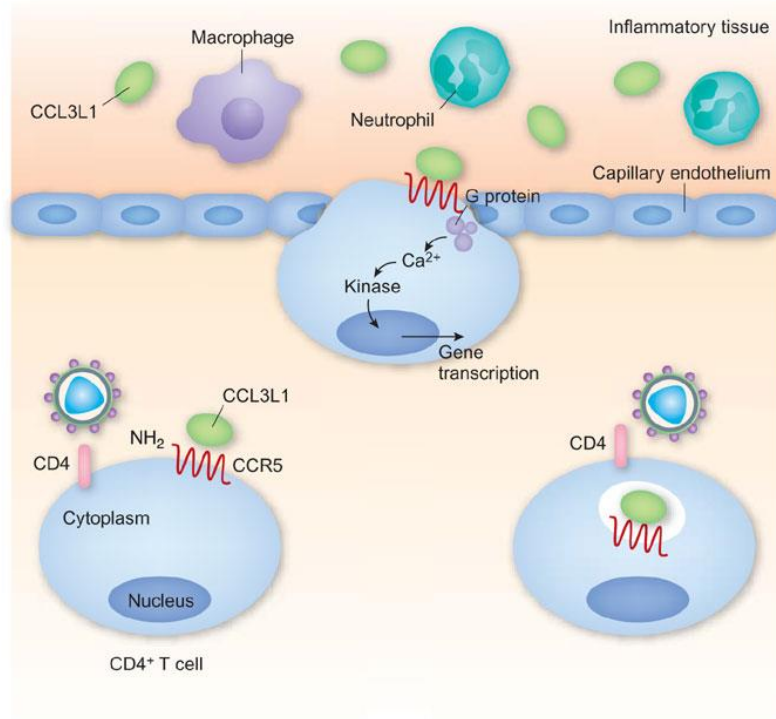
Kemokin aktivasyonunun önlenmesi kronik inflamatuvar cevap sırasındaki kemokine karşı oluşan yüksek afiniteli antikorların üretimi ile olmaktadır. Kandan dokuya lökosit geçişi selektinler, integrinler ve kemokinler tarafından düzenlenen bir seri olay sonucunda gerçekleşir. Sitokinler; lökosit havuzunu ve adezyon moleküllerini arttırarak lökositlerin kemokine olan cevabının artmasına neden olur. Bu bir dizi olay inflamasyonun özgülüğünü sağlar^{51,52,56,58,59}.

2. h. 5. Enfeksiyon Hastalıklarında Kemokinlerin Rolü

Kemokin reseptörleri 2 önemli insan patojeni için (*Plasmodium* ve HIV) koreseptör taşıır. *Plasmodium vivax* eritrositler üzerindeki DARC kemokin reseptörüne, HIV ise lenfosit ve makrofajlardaki CXCR4 ve CCR5 kemokin reseptörlerine bağlanır. Bu reseptörler hücreye girişı kolaylaştırarak viral tropizmi belirler. HIV başlangıçta virionu saran glikoprotein gp 120/41 ile en azından 2 hücrese reseptör (CD4 molekülü ve kemokin reseptörü) ile etkileşime girer. HIV-1'in makrofaj tropik susu (M-tropik suş) CCR5 kemokin reseptörünü kullanır. T tropik suş ise; T hücrede bulunan CXCR4 reseptörüne az bir kısmı da CCR5' e bağlanır. RANTES, MIP-1 α ve MIP-1 β , CCR5 reseptörüyle etkileşime girerek HIV-1' in M ve T tropik suşlarının hücreye girişini engeller. CCR5 geninde 32 baz- çift delesyonu için homozigot olan bireyler HIV-1 enfeksiyonuna dirençli olup, heterozigot olan bireylerde ise hastalık ilerleyici seyretmez ve fırsatçı enfeksiyonlara karşı koruyucudur^{58,59}.

2. h. 6. CCR5

1996' da ilk kez tanımlaan CCR5, CC kemokin ailesindendir. CCR5 aktivasyonu hücrelerde cAMP üretiminin inhibisyonu, Ca⁺² salınımının uyarılması, MAP kinaz aktivasyonu ile sonuçlanır^{57,61} (Şekil 11).



Şekil 11: CCR5 reseptörü

CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL8' e bağlanma yeteneğindedir. B 3 ligand patojenin hücre içine girişini engelleme yeteneğindedir.

CCR5, lenfosit, kandaki monosit/makrofaj, DH, primer ve sekonder lenfoid organlardan eksprese edilir. DH maturasyonunda önemlidir. Uyarılması birçok kemokin reseptörünün aktivasyonuna neden olur. T hücrelerin inflamasyon alanına gelişinde ve T hücre cevabının etki derecesinde yönlendiricidir. Th1 aktivasyonunda görev alır ^{52,56,58,61}.

CCR5' in Th1 yanıtta yer almasına rağmen, IL-2' den etkilenerek Th2 yanıtta yer almaz ⁵⁴.

2. h. 7. CX3CR1

CX3CL1/fraktalkin ligandının reseptörüdür. Periferik kan, nötrofil, monosit, T hücre, NK hücresi, beyin, iskelet kasından izole edilmiştir. CX3CR1, DH' lerin göçü, maturasyonunun başlaması ve DH' nin patojene adezyonunda başlatıcı görevi bulunmaktadır. Hücre yüzeyinde belirdikten sonra hücrenin yapışmasını kolaylaştırdığı için özellikle DH ve T hücreler arası trafiği düzenlemektedir^{52,58,59}

2. h. 8. CXCR4

Üzerinde en çok çalışılan kemokin reseptörlerindendir. “Fusin” olarak da bilinir. Monosit, DH, T ve B hücrelerinin yüzeyindeki varlığı maturasyonla arttığı gösterilmiştir. İmmün hücrelerden patojenin hücre içine girişini engellemekle görevlidir. CXCR4' ün daha çok Th2 tip yanıt ile ilgili olduğu düşünülmektedir^{52,54}.

CXCR4' ün gelişim, hematopoez, vaskülarizasyon ve organogeneziste rolleri bulunmaktadır. CCR5 ve CX3CR1' e benzer şekilde liganda bağlanmada önemlidir. SDF (Stromal cell-derived factor) ile direk bağlanabilme özelliğindedir^{54,55}.

2. 1. Dendritik hücreler

Dendrit, Yunanca “dendron” sözcüğünden türetilmiş olup, ağaç anlamına gelir. Uzun sitoplazmik uzantılarından dolayı nöronların dendritik uçlarına benzer. Dendritik hücreler (DH) immün yanıtın düzenlemesinde önemli rol oynayan; beyin, testis ve göz haricinde tüm dokularda bulunan; deri, burun mukozası, solunum ve gastrointestinal sistem gibi vücudun dışa açılan bölgelerinde antijen sunan hücrelerdir. DH' lerin öncelikli fonksiyonu antijen sunmak olduğundan bu hücrelere “profesyonel antijen sunan hücreler (ASH)” de denilmekte ve farklılaşmamış T lenfositleri

uyararak primer immün yanıtın oluşmasına yol açmaktadır. Bu fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için antijeni yakalama, antijeni işleme ve uygun ko-stimülan moleküllerle T hücreye sunma yeteneğine sahiptir. Aynı zamanda DH' ler B hücre fonksiyonlarının oluşumunda da etkili olduklarından humoral immünitenin gelişiminde de önemli rol oynamaktadır^{62,63}.

Diğer hemopoetik hücreler gibi kemik iliği progenitör hücrelerinden köken alırlar. Hücreler daha sonra dalak ve deride özelleşir. DH progenitörleri, kemik iliği dışında periferik kan, kord kanı ve timustan da kaynaklanabilir. Genel olarak ASH' lere (antijen sunucu hücreler) benzer ve yüzey antijeni taşır. DH' lerin gelişimi oldukça karışıktır. Basitçe, kemik iliğinde makrofajlarla ortak prekürsörlerden (CD14⁺, CD11a⁺), granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ve interlökin (IL)-4 aracılığı ile veya CD34⁺ hücrelerden, GM-CSF ve tümör nekrozis faktör (TNF)- α aracılığı ile gelişir^{64,65}.

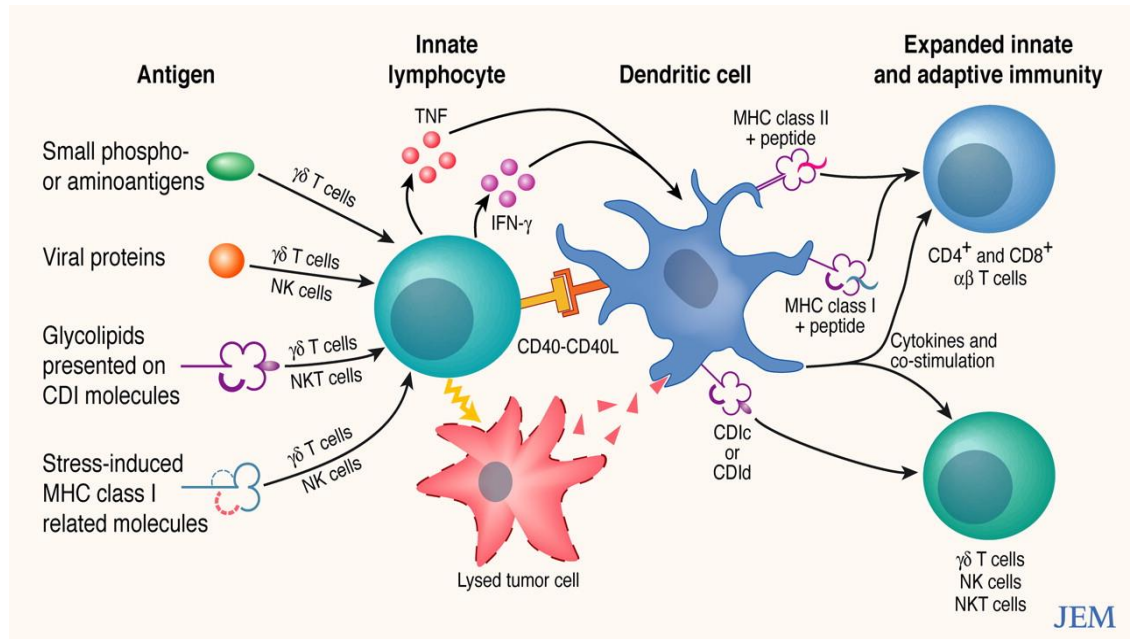
2. 1. 1. Fonksiyonları

DH' nin fonksiyonları, antijen sunumu ve T lenfosit aktivasyonu; immün toleransın oluşumu ve devamı; özellikle foliküler DH' de olmak üzere B lenfositler üzerinden humoral immünitenin oluşturulması olmak üzere 3 başlıkta toplanabilir.

1. Antijen Sunumu ve T Lenfosit Aktivasyonu: DH' ler CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositleri aktive etmek için antijeni yakalar, onları işleyip T lenfositlere sunar. İmmatür DH' ler kemik iliğinde yapıp tüm vücuda dağılır. Bu sırada DH' ler henüz herhangi bir patojen veya yabancı bir yapıyla karşılaşmadığından immatür halde vücutta hazır olarak beklemektedir^{63,64}. Aynı zamanda immatür DH' ler yabancı antijenleri daha kolay yakalamak için organların yüzeyine yerleşmiş olarak bulunur.

Matürasyon aşamasında DH' ler periferik dokudan sekonder lenfoid yapılara doğru harekete başlar ve orada T hücreleri uyaran matür DH' lere

dönüşür. Matürasyon sürecinde MHC molekülleri endositik kompartmandan hücre yüzeyine doğru çıkmaya başlar; antijenlerin ve patojenlerin hücre içine alımında selektif bir azalma ve T hücreleri için DH hücre yüzeyindeki ko-stimülör moleküllerde bir artış izlenir ^{62,65,66} (Şekil 12).



Şekil 12: Dendritik hücrelerin olgunlaşması ⁶⁷

Genelde, bir kez olgunlaşan ve lenf düğümüne giren DH, T hücreye 10 saate kadar antijen sunma yeteneğine sahiptir. T hücre stimülasyonu gerçekleşince de DH' ler apoptotik ölüme uğrar ve böylece geliştirilen immün yanıt dengelenir.

DH' lerin yüzeylerinde bulunan CD58 (LFA-3), CD54 (ICAM-1), CD50 (ICAM-3), CD102 (ICAM-2), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) gibi adezyon ve ko-stimulan moleküller ile T lenfositlerde bulunan CD2 ve

CD28 gibi moleküller ilişkiye girerek primer immün yanıtın başlaması için gerekli sekonder sinyalleri oluşturur^{65,66,68}.

3. İmmün Toleransın Oluşumu ve Devamı:

Matür DH'ler timusta bol miktarda bulunup, burada yeni üretilmiş T lenfositleri fonksiyonel CD8⁺ ve CD4⁺ hücreler olarak eğitirken aynı zamanda kendi vücuduna karşı geliştirebilecekleri immüniteyi engellemek için onları seleksiyona uğratar. Dolayısıyla da kendi antijenlerine karşı düşük afiniteye sahip T lenfositleri seçip, perifere çıkmasına ve yaşamasına olanak sağlar. DH' lerinin taşıdığı proteinlerle (self antijen) etkileşime giren T lenfositler timusta negatif seleksiyonla ortadan kaldırılır. Bu işlemlerin sonunda MHC peptitlerini çokiye tanıyan ancak self antijenlere duyarsız T lenfositler oluşmaktadır. Bu negatif seleksiyon işleminde timusta mevcut olan epitel hücreleri rol oynamaktadır^{65,69,70}.

T lenfositlerindeki periferik tolerans T lenfosit ölümü, anergi ve regülatör T lenfositlerin baskılamasıyla gerçekleşir. Th2 yanıtına yönelmiş DH, IL-10 üreterek T lenfositlerde apoptoza ve regülatör Th2 T lenfositlerin oluşumuna neden olmaktadır. Periferik toleransta ko-stimulan molekülleri eksik olan immatür karakterdeki DH' ler etkili olmaktadır.

3. B lenfosit Uyarımı:

DH' ler, lenf düğümünün T lenfosit alanlarında ve B lenfositlerin bulunduğu germinal merkezde uyarıyı, salgıladıkları çeşitli sitokin ve faktörler ile sağlar. Lenf düğümünün germinal merkezinde bulunan foliküler DH' ler, B lenfositlerin belleğinin gelişiminde önemli rol oynar. Foliküler DH' ler yabancı cisme karşı başlangıç antikor yanıtta etkili olmayıp, antikor yanıtı geliştikten sonra çok sayıda antijen antikor kompleksleri oluşturmaktadır. Foliküler DH' lerin antikorlar için depo ve B lenfosit uyarımının devamını sağlayan kaynak olarak görev yaptığı bilinmektedir. Bu B lenfositler antijeni foliküler DH' den alıp T lenfositlere sunabilir.

Foliküler DH' lerdeki antijen antikor kompleks deposunun aylar hatta yıllarca sürebilen uzun bir süreçte tüketilebileceği sanılmaktadır^{69,70}.

2. i. Kandidozda Tanı

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

Birçok *Candida* türünün tanısında karbonhidrat asimilasyon ve fermantasyon testleri gibi klasik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler ticari sistemler olarak piyasaya sunulmuştur (ID32C). Daha hızlı ve az zahmetli fenotipik tanımlama sağlayan RapID Yeast Plus System % 94.1 duyarlılıkla 4-5 saatte sonuç vermektedir^{2,3,71,72}.

Candida türlerinin ayırımında kullanılan kromojenik besiyerinde (CHROM agar) her türün belirli renk ve özellikte üremesi esasına dayanılarak tanımlama yapılmaktadır^{3,71}.

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

Sistemik kandidozun sadece klinik belirtiler ile tanınması oldukça zordur. Bu yüzden, tanı için kültür, serolojik, histopatolojik ve moleküler yöntemler kullanılmalıdır. Moleküler yöntemlerin kullanılmasının esas amacı, patojen mantarın klinik örnekte kültürü yapılmadan önce saptanması veya geleneksel yöntemlerle kültürde üretilmiş olan mantarın hızlı tanımlanmasıdır. Moleküler yöntemler diğer tanı yöntemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda, bu gerekliliğe cevap verebilecek geniş olanaklar sunmaktadır^{2,71}.

Son yıllarda çeşitli amaçlarla da kullanılan PCR yöntemi, birçok klinik örnekte mikroorganizmaya ait yapıları türe özgül olarak kısa sürede tespit edilebilmektedir^{2,3,71}.

2. i. 1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

İlk kez Kary Mullis tarafından uygulamaya başlatılan PCR; günümüzde moleküler biyolojinin vazgeçilmez araçlarından birini oluşturmaktadır. PCR, belirli bir DNA bölgesinin in vitro şartlarda enzimatik olarak çoğaltılmasında kullanılan bir tekniktir^{73,74}.

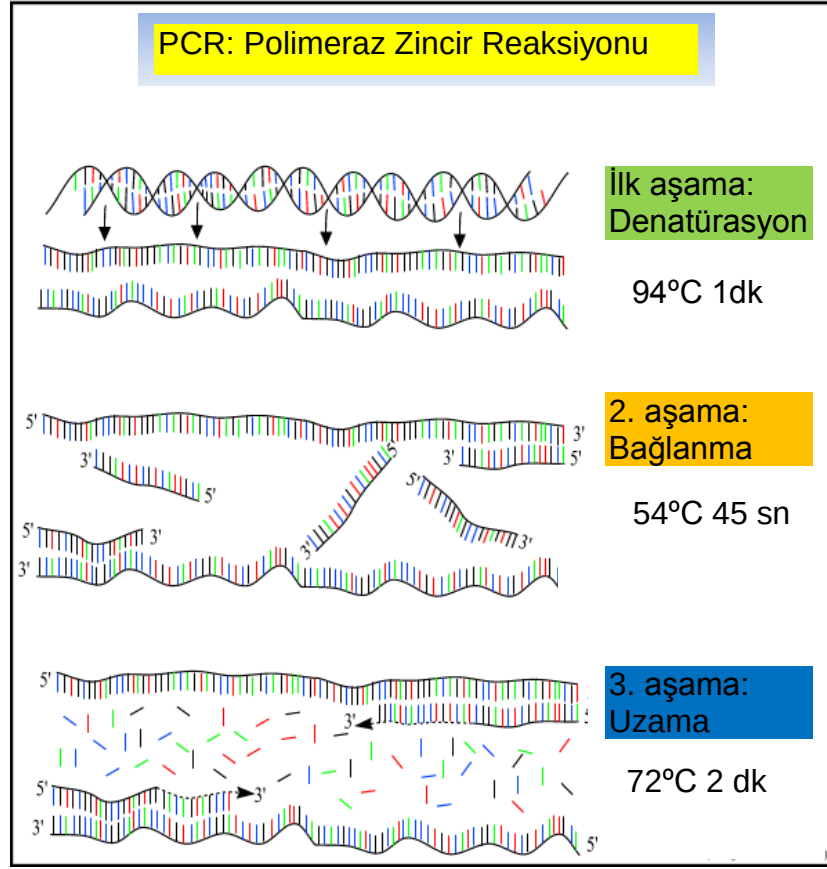
PCR reaksiyonu temel olarak çoğaltılması planlanan hedef bölgenin iki ucundaki DNA dizilerini özgül olarak tanıyıp karşı iplikçiklerini hibridize eden iki oligonükleotid primer, primerlere bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz, sentez için gerekli olan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

PCR temel olarak üç aşamalı bir yöntemdir. Bunlar;

1- Denatürasyon: Çift iplikli kalıp DNA'nın birkaç saniye 94-96°C ısı ile tek iplikli DNA'ya ayrılmasıdır. Ortalama 30-60 sn sürmektedir.

2- Baęlanma (annealing): Bu aşamada, sıcaklık dűřűrűlerek çoğaltılması amağlanan DNA bűlgesinin sınır uğlarına komplementer olan kısa (20-30 bazlık) tek zincirli yapılar olan primer çiftlerinin, hedef DNA yapısına tutunması sağlanır. Bu, hidrojen bağlarının yardımı ile olur Primerlerin, DNA' ya tutunmasını sağlayan sıcaklık, primerin baz içeriğiyle ve uzunluğuyla ilişkilidir. Baęlanma ısısı sadece DNA/DNA eşleşmesine imkan sağlayacak kadar yüksek olmalıdır.

3- Uzama (extansiyon=elongasyon): Yeni DNA oluşabilmesi için, hedef bűlge sınırlarına tutunmuş olan primerler, ısıya dayanıklı poimeraz enzimi yardımıyla ortamda bulunan dNTP' ler, hedef DNA' ya uygun olarak primerlerin ardısına eklenerek, primerlerin uzaması sağlanır. Uzama aşaması, DNA polimeraz enzimi yardımı ile ssDNA kalıplarına bağlanan primerlerin 5'-3' yűnde uzatılmasıdır (şekil13).



Şekil 13: PCR Yönteminin Aşamaları

PCR çalışmalarında reaksiyonun gerçekleşmesi için küçük miktarda hedef DNA (1-100ng kadar) örnek çalışma solüsyonu içerisine ilave edilir. Daha sonra örnekteki hedef çift sarmal (ds) DNA' nın, tek sarmal (ss) DNA'ya dönüştürülmesi sağlanır (denatürasyon). Tek DNA iplikçiklerinin karşısı, 20-30 baz çifti (bp) uzunluğundaki sentetik oligonükleotit diziler, DNA/RNA heterodubleksini oluşturmak üzere primer gibi kullanılır. Spesifik bir bölgenin amplifikasyonu için hedefi sınırlamak amacıyla ikinci primer kullanılır. Primerlerden birisi ssDNA zincirinde başlatıcı bölgeyi oluştururken, ikincisi de diğer zincir üzerinde sonlandırıcı bölgeye bağlanır (bağlanma). Taq DNA polimeraz enziminin yardımıyla, primerlerin bağlandığı bölgeden itibaren her ssDNA zincirinin

komplementeri oluşturulur (uzama). Böylece iki adet dsDNA (çift iplikli DNA) oluşur. Oluşan dsDNA'lar, yeni amplifikasyon için kalıp görevini üstlenir. Bu işlem 30 siklus tekrarlandığında birkaç saat içerisinde, hedefin kopyası elde edilebilir ^{74,75}.

Her primerin uzayan ürünü diğer primere kalıp görevi gördüğünden, her siklus, bir önceki siklusta meydana gelmiş olan DNA parça miktarını ikiye katlamaktadır. Bu geometrik birikim ile birkaç saat içindeki özgül hedef parçanın milyonlarca kopyası oluşmaktadır ⁷⁵.

Hedef DNA bölgesini çoğaltmak için genellikle 20-30 nükleotid uzunluğunda primerler kullanılmaktadır. Daha uzun primerler kullanıldığında özgülükte bir yükselme olmadığı gibi gereksiz yere maliyet artışı olmaktadır. Daha kısa primerler kullanıldığında ise istenmeyen bölgelere bağlanma meydana gelebilmekte ve özgül olamayan çoğaltma ürünleri ortaya çıkabilmektedir. Primerlerin mümkün ise ortalama olarak 4 bazın her birinden eşit sayıda içermesi ve tekrarlayan, sadece pürin ve pirimidin içeren dizilerden kaçınılması gereklidir. Primerlerin 3' ucunun guanin (G) ve sitozin (C)' den zengin olması bağlanmayı artırdığından tercih edilmelidir. Ayrıca primerlerin kendi kendilerine ve birbirleri üzerine bağlanabilirliğinin olmamasına dikkat edilmelidir. İki primerin ayrılma-bağlanma sıcaklıkları (Melting temperature= T_m) birbirine mümkün olduğunca yakın seçilmelidir ^{73,74,75}.

2. i. 1. 1. DNA Polimeraz

PCR tekniğinde ısıya dayanıklı DNA polimerazlarının kullanılmaya başlanması, PCR' in araştırma ve klinik laboratuvarlarda rutin bir teknik haline gelmesine neden olmuştur. PCR çalışmalarında kullanılmak üzere *Thermus aquaticus* adlı sıcak sularda yaşayan bir bakterinin ısıya dayanıklı olan DNA polimerazı (Taq DNA polimeraz) izole edilmiştir. Taq DNA polimerazın optimum çalışma sıcaklığının 72°C civarında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 95°C' de 40 dk. bekletildiğinde enzim aktivitesinin hâlâ %50' sinin korunduğu görülmüştür. Taq DNA polimerazın kullanılmaya başlaması ile hem her döngüden sonra reaksiyon karışımına yeniden polimeraz eklenmesine gerek kalmamış, hem de primerlerin özgül bölgelerine bağlandıktan sonra 37°C gibi düşük bir sıcaklığa inilmediği için, istenmeyen yerlere bağlanmaları engellenmiştir ^{73,75}.

DNA polimerazlar, orijinal ana DNA zincirlerinden bir tanesi kalıp olarak kullanılarak yeni bir tamamlayıcı DNA zinciri oluşturulurken, monomer deoksinükleotid trifosfatlardan uzun polinükleotid zincirlerin sentezine katalize eden enzimlerdir. Yalnızca DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, spesifik bölgelerin çoğaltılması gerçekleştirilir. Kullanılan polimeraz enzimine bağlı olarak kopyalanarak çoğaltılacak olan bölgenin uzunluğu Taq DNA polimeraz için 2 kilobazdan (kb) küçük, en fazla ise 40-50 kb olabilmektedir ^{73,74,75}.

2. i. 1. 2. Deoksinükleozid Trifosfatlar (dNTPs)

Saf deoksinükleosid trifosfatların dördünün ayrı ayrı bulunduğu veya dördünün bir arada bulunduğu stok solüsyonlar mevcuttur. Stok solüsyonlar çoğunun pH' sı NaOH ile 7.5' e ayarlanmıştır. PCR için genel olarak 100 µM dNTP konsantrasyonu gerekli olmakla birlikte daha düşük

dNTP konsantrasyonlarında (10-100 μ M) Taq DNA polimeraz daha iyi çalışmaktadır. Bununla birlikte optimal dNTP konsantrasyonları $MgCl_2$ konsantrasyonuna, reaksiyon durumuna, primer konsantrasyonuna, çoğaltılan ürünün uzunluğuna ve PCR döngü sayısına bağlıdır. Bazı PCR'lerin optimizasyonu sağlamak için en uygun dNTP konsantrasyonunun ampirik olarak belirlenmesi gerekebilmektedir^{73,74,76}.

2. i. 1. 3. Tamponlar

PCR' da DNA polimerazın daha iyi çalışmasını sağlayan birçok tampon bulunmaktadır. Fakat 1988 yılında Saiki ve arkadaşlarının tanımlamış olduğu tampon veya buna benzer tamponlar genel olarak kullanılmaktadır. Bu tampon final konsantrasyon olarak 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, % 0.01 jelatin, % 0.01 NP40 ve % 0.01 Tween 20 içermektedir.

2. i. 1. 4. $MgCl_2$

Mg^{+2} , DNA polimeraz enziminin çalışmasını sağlayan önemli bir kofaktördür. $MgCl_2$ ' ün son reaksiyon karışımındaki konsantrasyonu farklı oranlarda olabilmektedir. Bu nedenle en uygun olan $MgCl_2$ konsantrasyonunu belirlemek için 0.5-5.0mM aralığındaki $MgCl_2$ konsantrasyonlarının denenmesi gereklidir. Mg^{+2} iyonları, polimerizasyon sırasında dNTP' lerin yeni yapılmakta olan zincire eklenmesi çok önemlidir. Ayrıca polimeraz aktivitesini stimüle ettikleri gibi çift zincirli DNA' nın ayrılma-bağlanma sıcaklıklarını artırır ve primerlerin kalıp DNA' ya bağlanmalarını kolaylaştırır. $MgCl_2$ konsantrasyonun PCR ürünü ve özgülük üzerine çok önemli etkileri vardır. 1.0-1.5 mM $MgCl_2$

konsantrasyonu genellikle ideal olmakla birlikte, bazı durumlarda farklı Mg^{+2} miktarları gerekli olabilmektedir ^{75,76}.

2. i. 1. 5. Sıcaklık Döngüleri

PCR' in üç değişik sıcaklıktan oluşan denatürasyon, primer birleşmesi ve polimerizasyon basamakları bir döngüyü oluşturur. Bu döngülerin tekrarlanması ile DNA çoğaltılır. PCR karışımlarını içeren tüpler otomatik programlanabilen cihazlarla (Thermal cycler) sıra ile bu sıcaklıklarda, istenilen sürelerde tutulur. Bütün DNA zincirleri 94°C' de denatüre olduğu için hangi primer kullanılıyor olursa olsun ve hangi DNA çoğaltılırsa çoğaltılsın denatürasyon için genel olarak bu sıcaklık kullanılır. Primer birleşmesi için kullanılan sıcaklık, primerin nükleotid içeriğine göre değişir ve primerlerin ayrılma-bağlanma sıcaklıklarına göre belirlenir. Polimerizasyon sıcaklığı ise enzimin en iyi çalıştığı sıcaklıkta (Taq polimeraz için 72°C' de) hep aynı tutulur. Bu sıcaklıklarda denatürasyon, primer birleşmesi ve polimerizasyon için gereken süre aslında birkaç saniyedir. Ancak cihaz içerisindeki tüplerdeki karışımların tamamının bu sıcaklıklara ulaşması biraz süre gerektirebilir. İnce çeperli tüplerin kullanılması bu sürelerin kısaltılmasını sağlayabilir. İnce çeperli tür kullanılan tipik bir PCR programı şu şekildedir; 94°C' de 3 dk. denatürasyon sonrası 94°C' de 30-45 sn denatürasyon, primer bağlanma sıcaklığında (primere göre 50-70°C arasında bir sıcaklıkta) 30-45 sn primer birleşmesi ve çoğaltılan DNA' nın büyüklüğüne göre 45-60 sn 72°C' de polimerizasyon olmak üzere 35-45 döngü yapılır. En son 72°C' de 3 dk daha tutulması yarım kalan zincirlerin tamamlanmasını sağlar ^{73,75,76}.

2. i. 1. 6. Hedef

Tanısal PCR' ın özgüllüğü çoğaltım için uygun bir hedef dizisi seçilerek sağlanabilmektedir. Özgüllük, hedef dizi ve farklı cins veya türlerin DNA dizileri arasındaki homoloji derecesine bakılarak belirlenir. Örneğin; tüm mantarlarda ortak olan bir genin fazlaca korunmuş olan bir bölgesinin PCR protokolünde hedef dizi olarak seçilmesi bir enfeksiyonun bakteriyal veya mantar kaynaklı olduğunu göstermek için uygundur. Bu strateji birçok araştırmacı tarafından, çoğaltım için hedef dizi olarak fungal ribozomal RNA (rRNA) içindeki oldukça korunmuş bölgeler veya universal bölgeler seçilerek uygulanmıştır. rRNA genleri oldukça korunmuş bölgeler içerdikleri için ve tüm DNA' ların çoğaltılmasında kullanılabildiğinden ayrıca birbirine yakın türlerin identifikasyonunda kullanılabilen oldukça değişken bölgelere sahip olduklarından en fazla tercih edilen hedef genlerdir. rRNA genlerinin diğer bir avantajı da PCR duyarlılığını arttıran yüksek kopya sayısı göstermeleridir. Alternatif olarak özel cins veya türleri saptamak için bir genin oldukça değişken bir bölgesi daha yüksek bir özgüllük sağlayabildiğinden tercih edilmektedir. Bu amaçla rRNA genlerinin yanında mantar DNA genleri de hedef olarak seçilmiştir.

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

türlerin tanınmasında spesifik PCR primerlerinin geliştirilmesinde ideal bir başlatıcıdır^{71,75,76}.

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

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

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

yüksekliği primer hibridizasyonundaki sıklığı artırır ve primer bağlanması, uzaması veya her ikisini de engelleyebilecek olan RNA ikincil yapısının oluşmasını önler^{73,75}.

2. k. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Enzyme Immun Assay (EIA) olarak da adlandırılan bu yöntem esas olarak, özgül antijen-antikor bağlanmasını göstermek amacıyla enzimle işaretli konjugat ve enzim substratı kullanılarak renklendirilmesi esasına dayanır. Substrat, enzimin etki ettiği ve enzime spesifik olan maddedir.

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

Tanıda antijen veya antikor arama prensibine dayanarak kullanılan ELISA yöntemleri direk ELISA, indirek ELISA, dot- ELISA, kompetitif ELISA yöntemleridir.

Günümüzde birçok tanı laboratuvarlarında yaygın olarak ELISA testleri kullanılmaktadır. Bu testlerin avantajları arasında geniş enfeksiyon tanı parametrelerinin ticari olarak temin edilmesi, yöntemin otomasyona uyarlanabilirliği ve böylece çok sayıda örneğin kısa sürede çalışılabilmesi, sonuçların spektrofotometrede objektif olarak -kalitatif, semikantitatif ya da kantitatif- değerlendirilmesi gibi özellikler sayılabilir^{4,5}.

a) Katı Faz (Matriks): Manuel ELISA yöntemlerinde kullanılan katı faz, genellikle çukurlarına antijen veya antikor bağlanmış olduğu 96 çukurlu düz tabanlı polistern mikroplyetlerdir.

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

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

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

d) Durdurma: ELISA' nın son safhası olan "reaksiyonun durdurulması" basamağında asidik veya bazik çözeltiler (H_2SO_4 , HCl, NaOH) kullanılır. Böylece enzim-substrat reaksiyonu istenilen sürede sona erdirilir. Bu işlemin yapılmaması ya da geç yapılması, kromojenik substratın bir süre sonra kendiliğinden renk değiştirmesine, dolayısıyla da geçersiz sonuçların elde edilmesine yol açar.

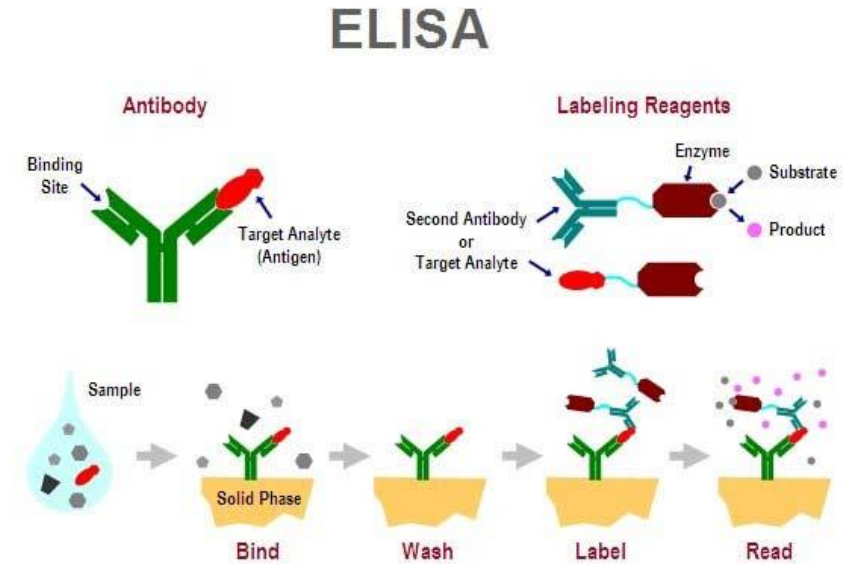
e) Okuma: Reaksiyon sonunda oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülür. Okumada en sık kullanılan dalga boyları 405, 450 ve 630 nm' dir. Sonuçlar tek bir dalga boyunda okutulabileceği gibi çift dalga boyuyla da okutulabilir. Çukurların renk şiddeti (optik dansite) örnekteki antikor veya antijenin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

ELISA yöntemi özgöl antijen-antikor bağlanmasını göstermek amacı ile enzimle işaretili konjugat ve enzim substratı kullanılarak renklendirilmesi esasına dayanır. Özgöl olan antikor antijen bağlanması sayesinde antikorlar ile örneklerdeki bu antikora özgöl antijenin varlığını, antijenler ile de özgöl antikorları tespit edilir ^{4,5}.

2. k. 1. ELISA Yönteminin Uygulanması

1. Katı faza bilinen bir antijen/antikor bağlanır.
2. Antijen/antikor bağılı çukurlara örnekler ve standartlar eklenerek oda ısısında veya 37°C' de belirli bir süre bekletilir.
3. İnkübasyon sonunda çukurlara eklenmiş olan örnekler dökölerek kuyucuklar tamponlanmış sıvı ile yıkanır. Çukura eklenen örnekler içinde özgöl antikor var ise katı fazdaki antijene bağlandığı için yıkama işlemi ile ortamdaki uzaklaştırılmaz.
4. Katı fazdaki antijene bağlanmış olan IgG yapısındaki antikor saptamak amacı ile çukurlara Fc kısmı enzim ile işaretili anti-IgG antikor eklenir. Enzim ile işaretili anti-IgG antikorları konjugat olarak tanımlanmaktadır.
5. Çukurlara konjugat eklendikten sonra plak belirli bir süre bekletilir. İnkübasyon sonunda çukurlara eklenen konjugat dökölür, tamponlanmış sıvı ile yıkanır.
6. Yıkama işlemi sonunda ortamda bağılı kalan konjugatın gösterilmesi amacıyla çukurlara konjugattaki enzime uygun substrat ve reaksiyonun görünür hale gelmesi için kromojen içeren karışım eklenir.
7. Çukurlara eklenmiş renksiz enzim substratı belirli bir süre sonrasında konjugattaki enzimin etkisiyle renklenir.
8. Enzim aktivitesini durdurmak amacı ile H₂SO₄ eklenir ve oluşan rengin koyuluğu ELISA okuyucusunda değerlendirilir. Plaktaki bazı çukurlara miktarı bilinmeyen standart antikor eklenirse, bu

çukurlardan elde edilen optik dansite (OD) eğrisi ile içeriği bilinmeyen örneklerdeki antikor miktarı saptanabilir (Şekil 14).



Şekil 14: ELISA yöntemi

2. k. 2. ELISA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

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

Kalitatif sonuç; sonuç veren bir yöntemde kitin önerisine göre “pozitif ve negatif kontrol serumları” veya “kalibratör serumlar” kullanılabilir. Bu serumların OD’ lerinden hesaplanan bir “cut off” (eşik değeri) vardır. Örneklerin OD’ leri buna göre değerlendirilerek pozitif ya da negatif diye

sonuç verilir. Bu tip sonuçlar genellikle antijen varlığının veya yokluğunun belirlenmesinde değerlidir.

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

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

2. I. *Candida* - TLR ve Kemokin ilişkisi

Fungal PAMP’ lar, yapıları nedeniyle spesifik TLR’ leri aktive etme yeteneğine sahiptir. Bu spesifite, mantarların hücre duvarında bulunan çeşitli yapıların varlığından kaynaklanmaktadır. TLR’ ler aracılığıyla fungal PAMP’ lar tanınmasına rağmen TLR’ ler patojenin ilk etapta direk olarak tanınmasını sağlayan reseptörler değildir. Fungal PAMP’ ların çoğu hakkında yeterli bilgi olmamasına karşılık üzerinde en çok çalışılan ajan *C. albicans*’ tır. *C. albicans*’ ın mutant varyantların spesifik hücre duvar bileşenlerinin net olarak bilinmesi nedeniyle PAMP’ ların

identifikasyonunda ilerlemeler kaydedilmiştir. Mutant ajanlar ya da defektli deney hayvanları kullanılarak yapılan çalışmalar sonucu, TLR2- β -glukan ilişkisi, fosfolipomannan- TLR2/6 ilişkisi, konidya/ hif ve TLR4 bağlantısı TLR9 ve genomik DNA ilişkisi gibi konular aydınlatılmıştır^{21,24,28,29}.

Candida'nın hücre yüzeyinde tutunmasının ardından, onu hücre içinde ilk olarak işleyen ajanların başında nötrofiller ve DH' ler gelmektedir. Fagositoz, öldürme ve antijenin sunumu görevlerini yerine getiren bu hücreler arası iletişim ve koordinasyon kemokinlerle sağlanmaktadır. Yapılan çalışmalar, kemokin eksikliklerinin invaziv kandidozun gelişiminde önemli roü olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, *Candida* enfeksiyonlarının invitro dendritik hücre kültüründe Toll-like reseptör (TLR2, 4, 6) ile kemokin (CCR5, CXCR4, CX3CR1) ifadelenmesi ve sekresyonları üzerine oluşturduğu değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Gereçler

3. 1. 1. Cihazlar

Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

Mikrosantrifüj (Heaeus, Almanya)

Santrifüj cihazı (Nüve, Türkiye)

Derin dondurucu (Uğur, Türkiye)

CO₂ Inkübatörü (Nuaire, İngiltere)

Hassas terazi (Kern, Almanya)

Su banyosu (Techne, İngiltere)

Otoklav (Sanyo, Japonya)

Spektrofotometre (Das Plate Reader, Almanya)

Sınıf 2 biyogüvenlik kabini (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

Kuru Isı Bloğu (Biosan, Türkiye)

Işık Mikroskobu (Olympus, Japonya)

Eppendorf (RNaz'dan yoksun)(Greiner Bio- One, Almanya)

Inverted Mikroskobu (Leica, Almanya)

Mikropipetler ve Uçları (Greiner Bio- One, Almanya)

Hücre Kültür Plağı (Corning, Amerika)

Hücre Kültür Flaskı (Corning, Amerika)

Etüv (Elektromag, Türkiye)

Thermal Cyclers (Apollo Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

UV Transluminatör (Syngene, İngiltere)

Elektroforez cihazı (Wealtec, Tayvan)

Light cyclers 2.0 (Roche, Almanya)

50' lik ve 15' lik Greiner (Greiner Bio-One, Almanya)

Steril Filtre (0,45 µm' lik)(Sartorius, Almanya)

Enjektör (Ayset, Türkiye)

Cell scraper (Greiner Bio-One, Almanya)

3. 1. 2. Kimyasallar

EZ-RNA Total RNA Isolation Kit (Biological Industries, İsrail)

Primerler (Biotec, Tayland)

dNTP (Bioron, Almanya)

Magnezyum (Bioron, Almanya)

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

Taq Polimeraz (Bioron, Almanya)

Agaroz (Onbio, Kanada)

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

Trisma Base (Sigma, Almanya)

EDTA (Fluka Biochemika, İsviçre)

Borik Asit (Sigma, Almanya)

Etidyum Bromür (Sigma, Almanya)

Orange G (Sigma, Almanya)

Etil Alkol (Riedel-de Haen, Almanya)
Saboroud Dextrose Agar (SDA) (Oxoid, İngiltere)
Tripan Mavisi (Applichem, Almanya)
RPMI Besiyeri (Biochrom AG, Almanya)
Siprofloksasin (Deva, Türkiye)
Penisilin-Streptomisin (Biochrom AG, Almanya)
 β -2 Merkaptotanol (Amresco, Amerika)
Fötal Sığır Serum (Biochrom AG, Almanya)
Fosfat Tamponu (Biological Industries, İsrail)
Fikol (Biological Industries, İsrail)
Esansiyel Aminoasit (Biological Industries, İsrail)
ELISA kitleri (Cusabio ve USCN, Çin)
GM-CSF (Biological Industries, İsrail)
IL-4 (Biological Industries, İsrail)
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Almanya)
LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Almanya)
EDTA (Sigma, Almanya)

3. 1. 3. Suşlar

Candida albicans ATCC 10231 referans suşu

Candida krusei ATCC 6258 referans suşu

3. 2. YÖNTEMLER

3. 2. 1. *C. albicans* ve *C. krusei* Suşlarının Hazırlanması

3. 2. 1. a. *C. albicans* ve *C. krusei* suşları

Çalışmamızda *C. albicans* ATCC 10231 ve *C. krusei* ATCC 6258 referans suşları kullanılmıştır. *C. albicans* ve *C. krusei* suşları -20°C’ deki stok kültürden SDA plağına yapılan canlandırma ekiminin, 35°C’ de 48 saat inkübe edilmesi ile elde edilmiştir. Kültür sonrası Tripan mavisi ile *Candida* hücrelerinin canlılığı incelenmiş ve thoma lamında sayılarak % 0.9 NaCl içinde 10^6 *Candida*/ml olacak şekilde Mc Farland standardına göre ayarlanmıştır.

3. 2. 1. b. Mayaların İnaktivasyonu

Çalışmada kullanılacak olan mayaların Mc Farland standartlarına uygun hazırlandıktan sonra 95°C’ de 1 sa inkübe edilerek inaktivasyonları sağlanmıştır.

3. 2. 2. İnsan Mononükleer Hücre Kültürünün Hazırlanması

3. 2. 2. a. Besiyerinin Hazırlanması

Ticari olarak saf RPMI-1640 besiyeri içine;

-% 10' luk FBS (Isı ile inaktive edilmiş) (56°C' de 30dk.)

-MEM Sodyum Piruvat

-100 U/ml Penisilin

-100 µg/ml Streptomisin

-2mM L-glutamin

-10 µg/ml Siprofloksasin (0.22 µ' lik filtreden süzülerek)

-0.05 mM β-2 merkaptoetanol eklenerek besiyeri içinde kimyasalların çözünmesi ve karışımı sağlanmıştır.

3. 2. 2. b. İnsan Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinin (MNH) İzolasyonu

- Sağlıklı gönüllülerden (40 kişi, yaklaşık 200 ml) alınan heparinize kan örneğinden MNH izolasyonu "Ficoll-hypaque density gradient centrifugation yöntemi" ile yapılmıştır.

- Kan örnekleri 1/1 oranında serum fizyolojik (SF) ile seyreltilmiştir.

- Yeni bir santrifüj tüpü içerisine Ficoll-hypaque konulmuş, üzerine seyreltilmiş kan örneği, steril pastör pipeti ile Ficoll-hypaque üzerine yayılmıştır.

- 2000 rpm' de 30 dk. süreyle oda ısısında santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj sonrasında tüpün üst kısmında bulunan plazma tabakası steril pastör pipeti ile dikkatli bir şekilde alınarak, ayrı bir tüpe aktarılmıştır.

- Lenfositleri içeren buffy coat tabakası (diğer tabakalara dokunulmadan) steril pastör pipeti ile ayrı temiz santrifüj tüpüne alınarak üzerine en az 2 kat olacak şekilde PBS eklenmiştir (lenfosit: PBS=1:2).

- Pastör pipeti ile hücreler süspansiyon edilerek 1200 rpm' de 18-20°C' de 10 dk. santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj sonrasında tüpün üst kısmında bulunan üst sıvı atılmıştır. Tüpün dibinde kalan çökeleğin üzerine 10 ml kadar PBS konulup, pastör pipeti ile karıştırılmıştır.

- 1200 rpm' de 18-20°C' de 10 dk. süreyle santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj sonrasında tüpün üst kısmındaki üst sıvı atılmıştır. Tüpün dibinde kalan ve içerisinde lenfositlerin bulunduğu çökelek, zenginleştirilmiş RPMI-1640 besiyeri ile süspansiyon edilmiştir.

3. 2. 2. c. MNH Hücrelerin Canlılık Kontrolü

İzole edilen MNH' nin hücre canlılığı, Thoma lamında Trypan blue boyama yöntemi ile incelenmiş ve canlı hücre sayımı yapılmıştır. Bu amaçla, eşit hacimde MNH ve trypan blue ile karıştırılarak mikroskopta hücreler incelenmiştir. Mikroskop altında boyanmayan hücreler canlı, boyanan hücreler ölü olarak değerlendirilmiştir.

3. 2. 3. MNH' lerden DH' lerin Oluşumu

- İzole edilen hücreler, hücre kültür flaskında 2 sa süreyle bekletilmiştir.
- İnkübasyon süresinin sonunda flaska yapışmayan hücreler zenginleştirilmiş besiyeri ile yıkanıp uzaklaştırılmıştır.
- Kalan hücrelere 800 IU/ml GM-CSF ve 400 IU/ml IL-4 içeren zenginleştirilmiş besiyeri eklenerek CO₂' li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon süresi boyunca her gün hücreler kontrol edilerek gelişimleri değerlendirilmiştir.
- Her 2 günde 1 olmak üzere GM-CSF + IL-4 karışımı içeren zenginleştirilmiş besiyeri ile indükleme yapılmıştır.
- İnkübasyon sonunda hücreler flasktan cell scraper ve trypsin-EDTA kullanılarak alınmıştır.
- Hücre sayımı ve canlılık kontrolü sonrası diğer aşamalara geçilmiştir.

3. 2. 4. Pozitif Seleksiyon Yoluyla MACS (Magnetic Cell Sorting) İle CD11c⁺ DH' nin Purifikasyonu

- Elde edilen hücreler 1200 rpm' de 5-10 dk. santrifüj edilmiştir.
- Üst sıvı atıldıktan sonra üzerine 0.5 ml MACS buffer ile 10 µl anti CD11c-PE antikoru eklenmiştir.
- Hücreler karıştırılarak 30 dk +4°C' de inkübe edilmiştir.
- 1200 rpm' de 5 dk. santrifüj edilerek üst sıvı atılmıştır.

- MACS buffer ile bir kez daha yıkanarak üst sıvı atılmıştır.
- MACS standındaki kolon MACS buffer ile yıkanarak ıslatılmıştır.
- Hücrelere 80 µl MACS buffer ile 20 µl anti-PE manyetik bead eklenerek 15 dk +4°C' de inkübe edilmiştir.
- Hücreler kolondan geçirilerek santrifüj tüpünde toplanmıştır.
- 1200 rpm' de 5-10 dk. santrifüj edilmiştir.
- Üst sıvı atılarak 1 ml zenginleştirilmiş RPMI içinde karıştırılmıştır.

3. 2. 5. Flow Sitometri İle CD11c⁺ DH' nin Analizi

CD11c⁺ DH' ler, pozitif seleksiyon yoluyla MACS ile saflaştırıldıktan sonra, hücreler flow sitometride değerlendirilmiştir.

3. 2. 6. Deney Ortamının Hazırlanması

3. 2. 6. 1. DH kültürü ile *Candida* türlerinin inkübasyonu

- DH hücreler kuyucuk başına 2×10^6 olacak şekilde besiyeri ile birlikte 24 kuyucuklu plaklara konulmuştur.
- Hücrelerin immünolojik yanıtını belirlemek amacıyla önceden inaktive edilen *Candida* suşları kuyucuk başına çeşitli oranlarda (1×10^6 , 2×10^6 , 4×10^6 , 8×10^6 , 10×10^6 olacak şekilde DH' ler ile karşılaştırılmıştır.
- Kontrol kuyucuğu olarak sadece DH, sadece *Candida*, sadece besiyeri içeren kuyucuklar kullanılmıştır.
- Kültür plakları %5' lik CO₂' li etüvde 37°C' de 0, 24 ve 48 sa süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

- Deneyin 0, 24, 48 saatlik inkübasyon süresi tamamlanan kuyucuklardaki üst sıvılar ve hücreler ependorflara toplanmıştır.
- Hücre ve üst sıvılar çalışılncaya kadar -80°C' de muhafaza edilmiştir.

3. 2. 7. Deney grupları

Deney grupları Tablo 4' te belirtildiği gibi hazırlanmıştır. DH miktarı her kuyucuk için 2×10^6 olarak belirlenmiştir. Her bir kontrol ve deney grubu 2' şer kuyucuk olarak çalışılmıştır.

Tablo 4: DH kültürü içeren kuyucukların dağılımı (24 ve 48 sa için)

Örnek	Kontrol kuyucukları	Örnek	Deney kuyucukları
Örnek 1	Besiyeri	Örnek 14	DH + 1×10^6 <i>C. kru</i> + Besiyeri
Örnek 2	DH + 1×10^6 <i>C. alb</i> + Besiyeri	Örnek 15	DH + 2×10^6 <i>C. kru</i> + Besiyeri
Örnek 3	DH + 2×10^6 <i>C. alb</i> + Besiyeri	Örnek 16	DH + 4×10^6 <i>C. kru</i> + Besiyeri
Örnek 4	DH + 4×10^6 <i>C. alb</i> + Besiyeri	Örnek 17	DH + 8×10^6 <i>C. kru</i> + Besiyeri
Örnek 5	DH + 8×10^6 <i>C. alb</i> + Besiyeri	Örnek 18	DH + 10×10^6 <i>C. kru</i> + Besiyeri
Örnek 6	DH + 10×10^6 <i>C. alb</i> + Besiyeri	Örnek 19	1×10^6 <i>C. kru</i> + Besiyeri
Örnek 7	1×10^6 <i>C. alb</i> + Besiyeri	Örnek 20	2×10^6 <i>C. kru</i> + Besiyeri
Örnek 8	2×10^6 <i>C. alb</i> + Besiyeri	Örnek 21	4×10^6 <i>C. kru</i> + Besiyeri
Örnek 9	4×10^6 <i>C. alb</i> + Besiyeri	Örnek 22	8×10^6 <i>C. kru</i> + Besiyeri
Örnek 10	8×10^6 <i>C. alb</i> + Besiyeri	Örnek 23	10×10^6 <i>C. kru</i> + Besiyeri
Örnek 11	10×10^6 <i>C. alb</i> + Besiyeri		
Örnek 12	DH + Besiyeri (<i>C. alb</i>)		
Örnek 13	Besiyeri		
Örnek 24	DH + Besiyeri (<i>C. kru</i>)		

3. 2. 8. Kontaminasyona Karşı Koruma

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

3. 2. 9. ELISA

Derin dondurucudaki (-80°C) üst sıvı örnekleri çıkarılarak TLR2, TLR4, TLR6, CCR5, CXCR4, CX3CR1 parametrelerini içeren TLR ve kemokinlerinin düzeyleri ELISA yöntemi ile firmanın önerileri doğrultusunda kit içerisindeki talimatlara uygun şekilde belirlenmiştir (Cusabio ve USCNK, Çin).

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

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

- Inkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır ve Streptavidin- Peroksidaz (HRP) solüsyonu eklenmiştir.

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

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

- Kuyucuklarda oluşan reaksiyon Stop solüsyonu ile durdurulmuştur.

- Kuyucuklarda oluşan absorbans değerleri, ELISA okuyucusunda 450 nm' de okutularak değerlendirilmiştir.
- Standart eğri, her plak için uygun olan ilgili parametrenin standartları ile oluşturulmuştur.
- Örneklerle ait bakılan parametrelerin düzeyleri, standart eğri üzerinde işaretlenerek, DH' lere ait TLR ve kemokin düzeyleri pg/ml veya ng/ml cinsinden belirlenmiştir.

3. 2. 10. PCR

Candida türleri ile enfekte edilmiş DH kültürlerinde TLR ve kemokin ifadenmesini araştırmak amacıyla hem inhouse PCR hem de Real-time PCR yöntemleri kullanılmıştır.

3. 2. 10. 1. Hücrelerden mRNA Eldesi

Hücre kültürü sonucu elde edilen ve çeşitli oranlarda DH ve *Candida* kombinasyonları içeren deney gruplarına ait hücrelerden mRNA izolasyonu EZ-RNA Total RNA isolation kit kullanılarak yapılmıştır. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda, mRNA izolasyonu aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır.

- Derin dondurucudan çıkarılan örneklerin oda ısısına gelmesi beklenmiştir.
- Örnekler spin santrifüj yapılmıştır.
- Örneklerle 0.5ml denatürasyon solüsyonu pipetaj yapılarak eklenmiştir.
- Oda ısısında 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.

- Üzerine 0.5ml ekstraksiyon solüsyonu eklenerek hafifçe çalkalanmıştır.
- Örnekler 10 dk oda ısısında bekletilmiştir.
- İnkübasyon sonrası örnekler 12000g' de 15 dk +4°C' de santrifüj edilmiştir.
- Ekstraksiyon solüsyonu ile yapılan işlemler tekrarlanmıştır.
- Santrifüj sonrası oluşan üst sıvı yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- Üzerine 0.5 ml izopropanol eklenerek oda ısısında 10 dk bekletilmiştir.
- İnkübasyon sonrası örnekler 12000g' de 8 dk +4°C' de santrifüj edilmiştir.
- Örnekler 30 dk -20°C' de bekletilmiştir.
- Süpernatant tek seferde dökülerek pellet 1 ml % 75' lik etanol ile yıkanmıştır.
- İnkübasyon sonrası örnekler 7500g' de 5 dk +4°C' de santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant dikkatli bir şekilde atılarak oda ısısında tüpler kurumaya bırakılmıştır.
- Üzerine 100 µl DEPC-treated water eklenmiştir.
- Örnekler 10-15 dk 55°C' de bekletilmiştir.
- İnkübasyon sonrası örnekler -80°C' ye kaldırılmıştır.

3. 2. 10. 2. Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) İle cDNA Eldesi

cDNA elde etmek üzere Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Almanya) kullanılmıştır. Uygulamaya ait oranlar Tablo 5 ve 6' da gösterilmiştir.

Tablo 5: Birinci primer bağlanma miski (1X için)

Bileşen	Miktar
RNA	3 µl
Anchored primer	1 µl
Su	9 µl
Total Hacim	13 µl

- Hazırlanan miksten ependorflara aktarılmıştır.
- 10 dk. 65°C' de bekletilmiştir.
- Ependorflar buzda bekletilmiştir.
- Bu arada diğer miks hazırlanmıştır.

Tablo 6: cDNA sentezi için miks (1X'lik)

Bileşen	Hacim
Tampon	4 µl
RNAaz inhibitör	0.5 µl
dNTP	2 µl
Revers Transkriptaz	0.5 µl
Total Hacim	20 µl

- Buzda bekleyen ependorflara yeni miksten eklenmiştir.
- 30 dk. 55°C' de inkübe edilmiştir.
- Isıtıcıda 85°C' de 5 dk. bekletilmiştir.
- Sonra buzda aktararak -20°C' de saklanmıştır.

3. 2. 10. 3. cDNA İzolasyonunun Kontrolü

Elde edilen cDNA' ların kalitesi Nanodrop (Thermus) cihazı yardımıyla kontrol edilmiştir.

3. 2. 10. 4. TLR (TLR2, 4, 6) ve Kemokin (CCR5, CXCR4, CX3CR1) PCR

DH' lerde TLR ve kemokin ifadenmesi RT-PCR ile araştırılmıştır. RT-PCR ile çalışılacak TLR ve kemokinlere ait primerler Tablo 7' de gösterilmiştir.

Tablo 7: TLR ve kemokin RT-PCR Çalışmasında Kullanılan Primerler

TLR / kemokin	Primer Diziler
TLR2 (F)	5-‘GGCATGTGCTGTGCTCTGTT-3’
TLR2 (R)	5-‘GCTTTCCTGGGCTCCTTTT-3’
TLR4 (F)	5-‘GCGTGGAGGTGGTTCCTAATA-3’
TLR4 (R)	5-‘AGGTCCAGGTTCTTGTTGAG-3’
TLR6 (F)	5-‘AATAGAGGAAGCCCACTAAAGGA-3’
TLR6 (R)	5-‘AGTCACAGCCAACACCAGCA-3’
CX3CR1 (F)	5-‘ TGA CTGGCAGATCCAGAGGTT-3’
CX3CR1 (R)	5-‘ TTCTGTCACTGATTCAGGGAACTG-3’
CXCR4 (F)	5-‘ TTGCCGACTATGCCAGTCAA-3’
CXCR4 (R)	5-‘ CCGGGATGAAAACGTCCAT-3’
CCR5 (F)	5-‘ TGT GGG CAACAT GCT GGT CAT C-3’
CCR5 (R)	5-‘ AAA CAC AGC CAC CAC CCA AGT G-3’

3. 2. 10. 5. RT-PCR İle Ürün Saptanması

CX3CR1, CXCR4, CCR5, TLR2, TLR4, TLR6 için PCR, yaklaşık 10 ng cDNA, içerisinde 20 pmol oligonükleotit primeri her bir 0.5 ml' lik ependorfa, her bir dATP, dTTP, dCTP ve dGTP' den 250 µM, 3mM MgCl₂, 2.5 U Taq DNA polimeraz ve 10X tampon eklenerek total hacim 25 µl olacak şekilde karışım hazırlanmıştır (Bütün kimyasallar Thermus, Almanya) (Tablo 8 ve 9). Amplifikasyon prosedürü; 94°C' de 1 dakika, bunu izleyen 35 siklusta 94°C' de 30 saniye, her bir primer için uygun olan bağlanma derecesinde 45 saniye ve 72°C' de 30 saniye, finalde ise 72°C' de 5 dakika thermal cyler' da (Apollo Metis, Türkiye) örneklerin tutulması esasına dayanmaktadır. Primerlerin bağlanma sıcaklıkları; CX3CR1 için 51°C, CXCR4 için 56°C, CCR5 primerleri için 55°C, TLR2 için 50°C, TLR4 için 52°C, TLR6 için 51°C' dir.

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

Tablo 8: PCR Reaksiyon Karışımı (cDNA Çoğaltılması İçin)

Reagent	Hacim (1 örnek için)	Konsantrasyon
PCR tamponu, 10X	2 µl	1X
MgCl ₂	2.5 µl	3 mM
dNTP	0.2 µl	250 µM
Primer 1	0.2 µl	20 pmol
Primer 2	0.2 µl	20 pmol
Taq Polimeraz	1 µl	2.5 U
Su	15.9 µl	—
cDNA	3 µl	10 ng

Tablo 9: cDNA oğaltılması İçin Yapılan PCR Sıcaklık Döngüleri

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1X	94°C	1 dakika
35X	94°C Primer için bağlanma sıcaklığı* 72°C	30 saniye 45 saniye 30 saniye
1X	72°C	5 dakika

* CX3CR1 için 51°C, CXCR4 için 56°C, CCR5 primerleri için 55°C, TLR2 için 50°C, TLR4 için 52°C, TLR6 için 51°C' dir.

3. 2. 10. 6. Real-Time PCR (SYBR Green I) ile TLR ve Kemokin Reseptörlerinin İfadelenmesinin Saptanması

CX3CR1, CXCR4, CCR5, TLR2, TLR4, TLR6 için Real time PCR (SYBR Green I), yaklaşık 10 ng cDNA, 0.5 ml' lik ependorfa, 10X 25 mM MgCl₂, DNA Master SYBR Green miks, 20 pmol oigonükleotit primeri eklenerek total hacim 10 µl olacak şekilde karışım hazırlanmıştır (Tablo 10). Amplifikasyon prosedürü; 95°C' de 30 saniye, bunu izleyen 45 siklуста 95°C' de 0 saniye, her bir primer için uygun olan bağlanma derecesinde 10 saniye ve 72°C' de 30 saniye, finalde ise 65°C' de 10 saniye Light cyclers PCR cihazında (Roche, Almanya) örneklerin tutulması esasına dayanmaktadır. Primerlerin bağlanma sıcaklıkları; CX3CR1 için 59°C, CXCR4 için 56°C, CCR5 primerleri için 55°C, TLR2 için 57°C, TLR4 için 50°C, TLR6 için 58°C' dir (Tablo 10).

Tablo 10: SYBR Green için hazırlanan PCR reaksiyon karışımı

Reagent	Hacim (1 örnek için)	Konsantrasyon
SYBR Green tamponu, 10X	1 µl	1X
MgCl ₂	2 µl	25 mM
Primer 1	0.5 µl	20 pmol
Primer 2	0.5 µl	20 pmol
Su	3.5 µl	—
cDNA	2.5 µl	10 ng

Tablo 11: Real-time PCR (SYBR Green) Sıcaklık Döngüleri

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1X	95°C	30 saniye
45X	95°C Primer için bağlanma sıcaklığı* 72°C	0 saniye 10 saniye 30 saniye
1X	65°C	10 saniye

3. 2. 10. 7. İstatistiksel Analiz

Deney grupları arasında TLR ve kemokin düzeylerinin karşılaştırılmasında ANOVA testi (one-way analysis of variance), deneysel sayılar ve yüzdeler kullanılarak, bağımsız gruplar için Fisher' in ki-kare testi kullanılmıştır. $p \leq 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

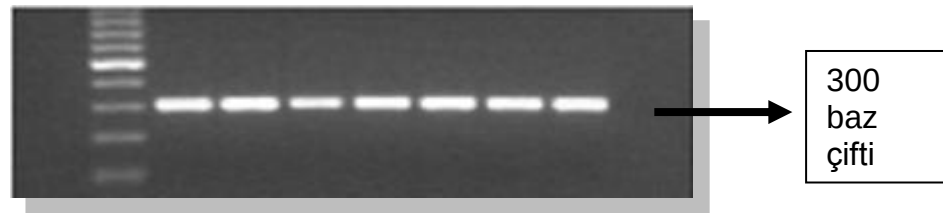
4. 1. DH Analizi

Flow sitometri analizinde CD11c⁺ ifade eden hücreler % 94.7 oranında tespit edildi.

4. 2. DH Kültürlerinde DNA Varlığının Doğrulanması

4. 2. a. DH Kültürlerinde DNA Varlığının Doğrulanması

Hücre kültüründe DNA varlığı pozitifliğini göstermek amaçlı bakılan β -aktin kontrol ve enfekte örneklerde pozitif olarak bulunmuştur. Şekil 15' te bazı kontrol ve enfekte DH kültür örneklerine ait β -aktin primeri ile yapılan PCR sonuçları görülmektedir.



Şekil 15: Bazı kontrol ve enfekte DH' lerde β -aktin

4. 2. b. cDNA İzolasyonunun Doğrulanması

Elde edilen cDNA' ların kalitesi Nanodrop (Thermus) cihazı yardımıyla kontrol edilmiştir. Örneklerle ait DNA ölçümleri Tablo 12' deki gibidir.

Tablo 12: cDNA ng/ml değerleri

Örnek	DNA konsantrasyonu (ng/ul)	Örnek	DNA konsantrasyonu (ng/ul)
Örnek 1	1.129	Örnek 13	1.091
Örnek 2	3879.7	Örnek 14	3298.9
Örnek 3	4064.8	Örnek 15	3477.2
Örnek 4	4290.9	Örnek 16	3566.9
Örnek 5	4378.2	Örnek 17	3782.1
Örnek 6	4398.1	Örnek 18	3902.5
Örnek 7	1218.0	Örnek 19	1006.5
Örnek 8	1520.9	Örnek 20	1289.3
Örnek 9	1679.2	Örnek 21	1403.6
Örnek 10	1707.4	Örnek 22	1788.9
Örnek 11	1856.6	Örnek 23	1892.4
Örnek 12	2188.7	Örnek 24	2381.7

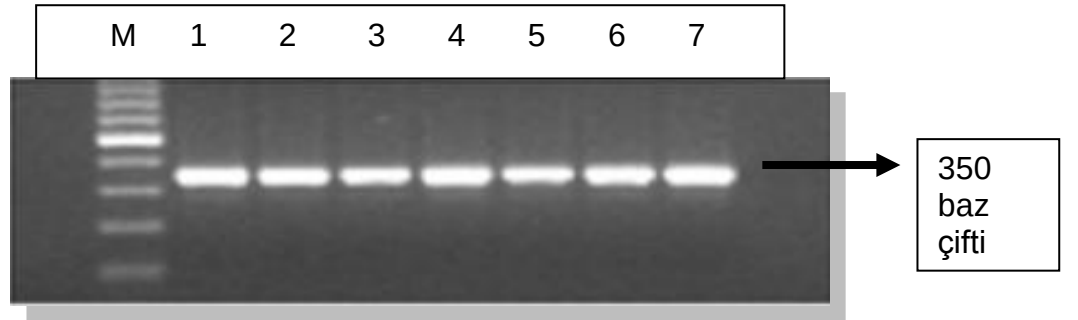
4. 3. DH Kùltùrlerinde TLR ve Kemokin İfadelenmesinin RT-PCR Sonuçları

4. 3. a. TLR2 İfadesinin Gösterilmesi

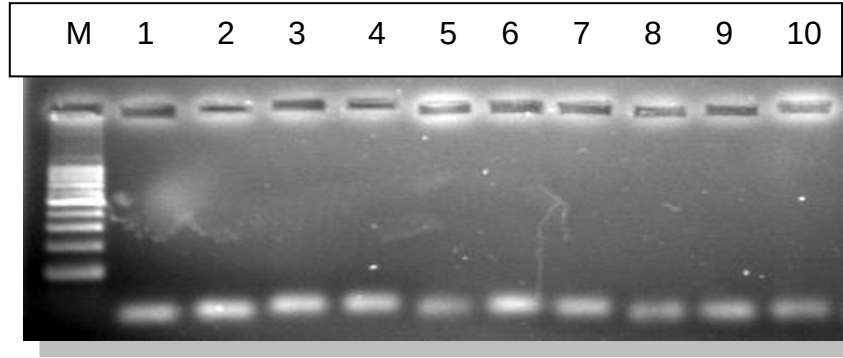
TLR2 ifadelenmesinin değeriendirilmesi amacıyla, oluşturulan kontrol ve deney kuyucuklarının 24 ve 48 sa' lik aşamaları jelde incelenmiştir.

Jel görüntülemesi sonucunda, hem 24 sa hem de 48 saatteki 14 kontrol kuyucuğunun hiçbirinde (0/14) (%0), TLR2 ifadelenmesini gösteren bant elde edilememiştir. 10 enfekte grubunun tamamında (10/10) (%100) TLR2' nin 350 baz çiftlik ürünü elde edilmiştir.

TLR2 ifadelenmesi, *C. albicans* ve *C. krusei* ile enfekte tüm kuyucuklarda gözlenmiştir (Şekil 16 ve 17).



Şekil 16: *C. albicans* ve *C. krusei* ile enfekte DH' lerde TLR2 pozitifliği



Şekil 17: Kontrol kuyucuklarında TLR2 ifadenmesi

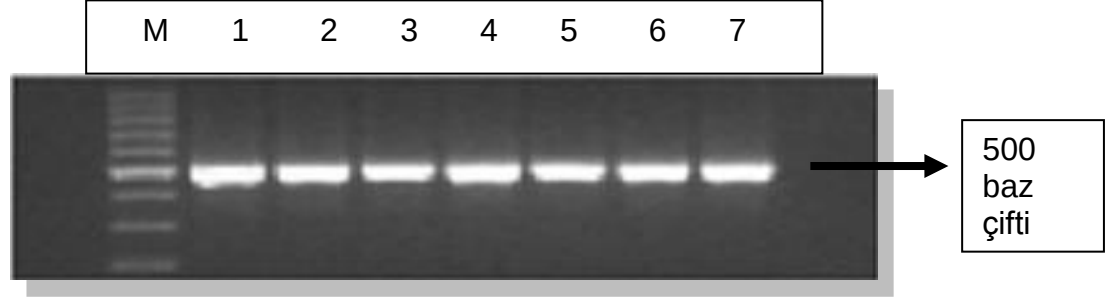
4. 3. b. TLR4 İfadesinin Gösterilmesi

TLR4 ifadenmesinin değerlendirilmesi amacıyla, oluşturulan kontrol ve deney kuyucuklarının 24 ve 48 sa' lik aşamaları jelde incelenmiştir.

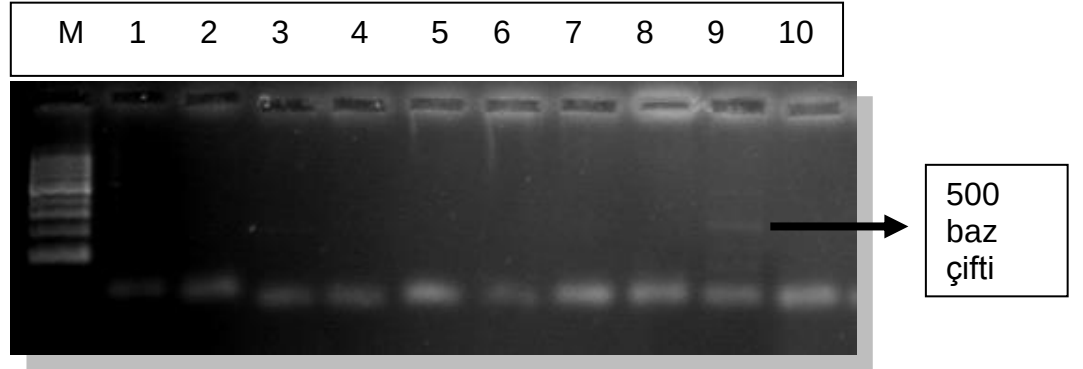
Jel görüntülemesi sonucunda, hem 24 sa hem de 48 saatteki 14 kontrol kuyucuğunun 1' inde (1/14) (%7.14) , 10 enfekte grubun 9' unda (9/10) (%90) TLR4' e ait 500 baz çiftlik ürün elde edilmiştir.

TLR4 ifadenmesi, *C. albicans* ve *C. krusei* ile enfekte tüm kuyucuklarda gözlenmiştir (Şekil 18 ve 19).

C. albicans ve *C. krusei* ile enfekte olan DH' lerden TLR4 ifadenmesi açısından bir fark bulunamamıştır.



Şekil 18: *C. albicans* ve *C. krusei* ile enfekte DH' lerde TLR4 pozitifliği



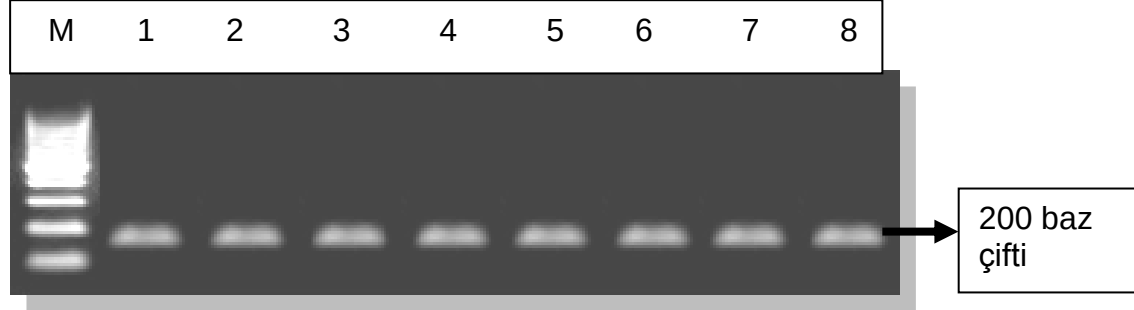
Şekil 19: Kontrol kuyucuklarında TLR4 ifadenmesi

4. 3. c. TLR6 İfadesinin Gösterilmesi

TLR6 ifadenmesinin değeriendirilmesi amacıyla, oluşturulan kontrol ve deney kuyucuklarının 24 ve 48 sa' lik aşamaları jelde incelenmiştir.

Jel görüntülemesi sonucunda, hem 24 sa hem de 48 saatteki 14 kontrol grubundan hiçbirinde (0/14) (%0), 10 enfekte grubun 9' unda (9/10) (%90) 200 baz çiftlik TLR6 ifadenmesini gösteren ürün elde edilmiştir.

TLR6 ifadenmesi, *C. albicans* ve *C. krusei* ile enfekte kuyucuklarda farklılık göstermemiştir (Şekil 20 ve 21).



Şekil 20: *C. albicans* ve *C. krusei* ile enfekte DH' lerde TLR6 pozitifliği



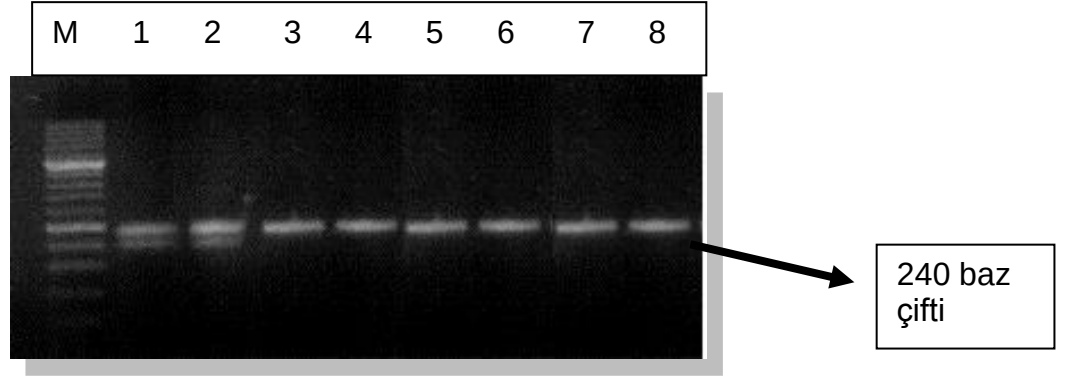
Şekil 21: Kontrol kuyucuklarında TLR6 ifadenmesi

4. 3. d. CCR5 İfadesinin Gösterilmesi

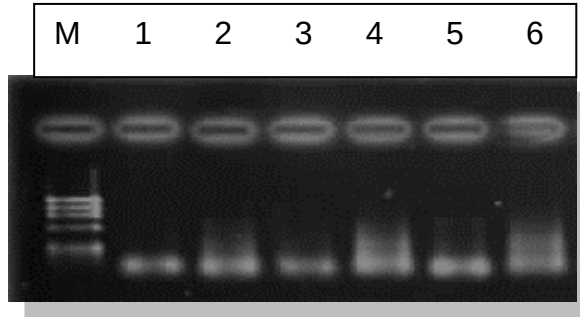
CCR5 ifadenmesinin değerlendirilmesi amacıyla, oluşturulan kontrol ve deney kuyucuklarının 24 ve 48 sa' lik aşamaları jelde incelenmiştir.

Jel görüntülemesi sonucunda 14 kontrol kuyucuğunun hiçbirinde (0/14) (%0), 10 enfekte grubun 10' unda (10/10) (%100) 240 baz çiftlik CCR5' e ait ürün elde edilmiştir.

CCR5 ifadenmesi, *C. albicans* ve *C. krusei* ile enfekte kuyucuklarda farklılık göstermemiştir (Şekil 22 ve 23).



Şekil 22: Enfekte DH' lerde CCR5 ifadelenmesi



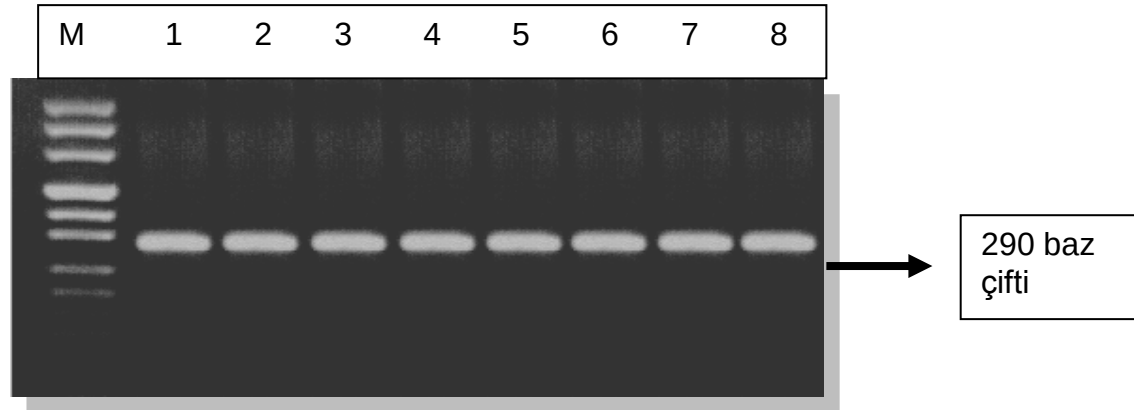
Şekil 23: Kontrol grubunda CCR5 ifadelenmesi

4. 3. e. CXCR4 İfadesinin Gösterilmesi

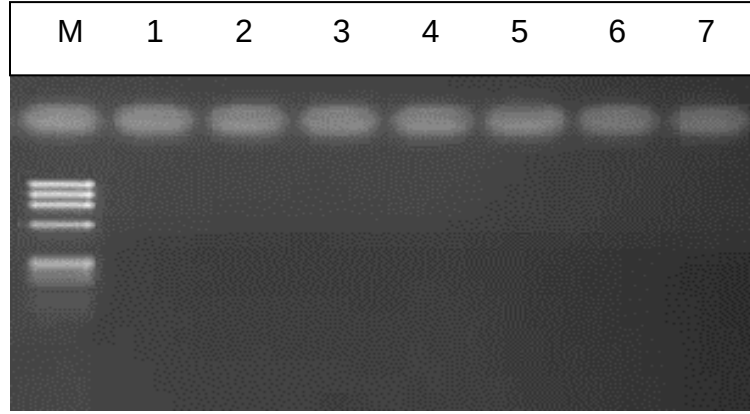
CXCR4 ifadelenmesinin değerlendirilmesi amacıyla, oluşturulan kontrol ve deney kuyucuklarının 24 ve 48 sa' lik aşamaları jelde incelenmiştir.

Jel görüntülemesi sonucunda 14 kontrol kuyucuğunun hiçbirinde (0/14) (%0), 10 enfekte kuyucuğun 9' unda (9/10) (%90) 290 baz çiftlik ürün elde edilmiştir.

CXCR4 ifadelenmesi, *C. albicans* ve *C. krusei* ile enfekte kuyucuklarda farklılık göstermemiştir. (Şekil 24 ve 25).



Şekil 24: *C. albicans* ve *C. krusei* ile enfekte DH' lerde CXCR4 ifadelenmesi

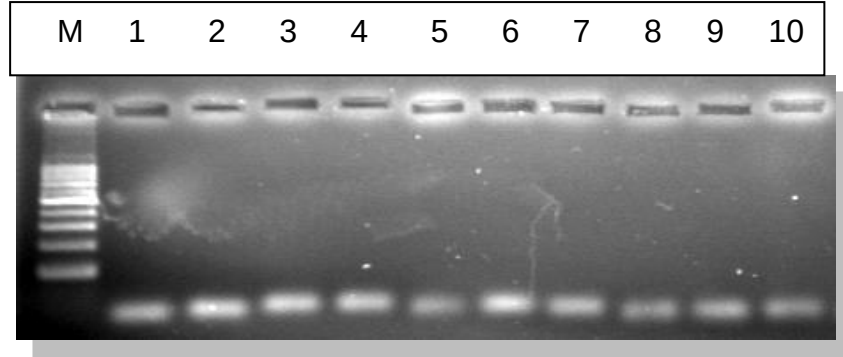


Şekil 25: Kontrol kuyucuklarında CXCR4 ifadenmesi

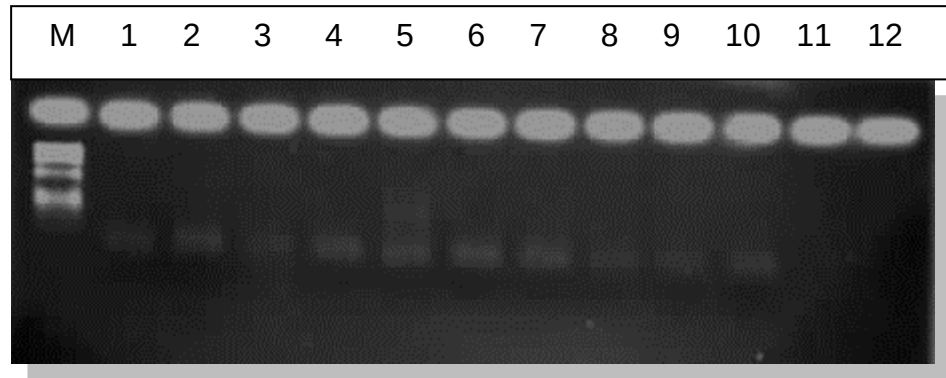
4. 3. f. CX3CR1 İfadesinin Gösterilmesi

CX3CR1 ifadenmesinin değerlendirilmesi amacıyla, oluşturulan kontrol ve deney kuyucuklarının 24 ve 48 sa' lik aşamaları jelde incelenmiştir.

C. albicans ve *C. krusei* ile enfekte kuyucukların ve kontrol kuyucuklarının hiçbirinde jel görüntülemesi sonucu CX3CR1 ifadenmesini gösterecek herhangi bir bant gözlenmemiştir (0/10) (0/14) (%0) (Şekil 26 ve 27).



Şekil 26: *C. albicans* ve *C. krusei* ile enfekte DH' lerde CX3CR1 ifadelenmesi

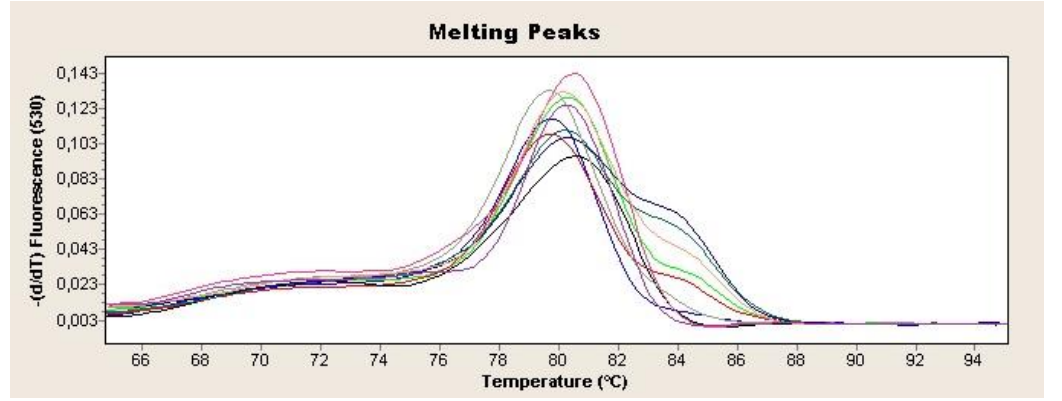


Şekil 27: Kontrol kuyucuklarında CX3CR1 ifadelenmesi

4. 4. DH Kùltùrlerinde TLR ve Kemokin İfadelenmesinin Real Time-PCR Sonuçları

4. 4. a. TLR2 İfadelenmesi

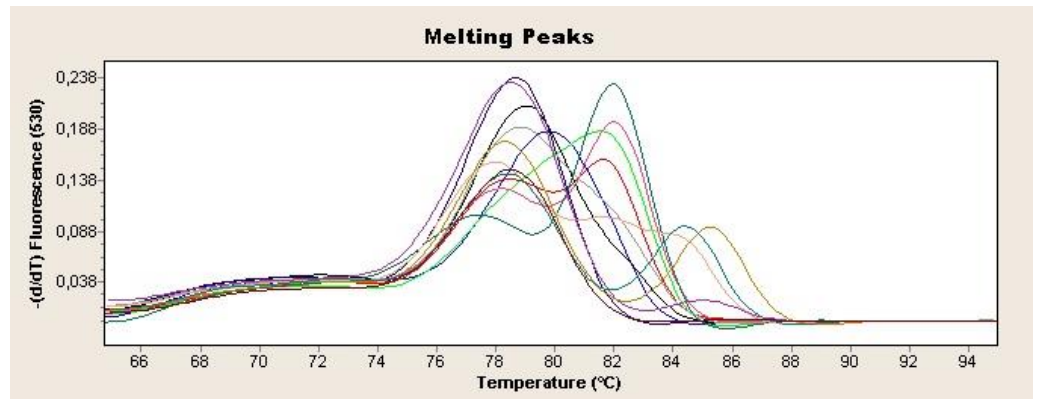
SYBR Green ile yapılan PCR reaksiyonunda, *C. albicans* ve *C. krusei* ile enfekte DH' lerde TLR2 ifadelenmesinde pozitiflikler gözlenmiştir (Şekil 28).



Şekil 28: TLR2 ifadelenmesinin Real-time PCR ile gösterilmesi

4. 4. b. TLR4 İfadelenmesi

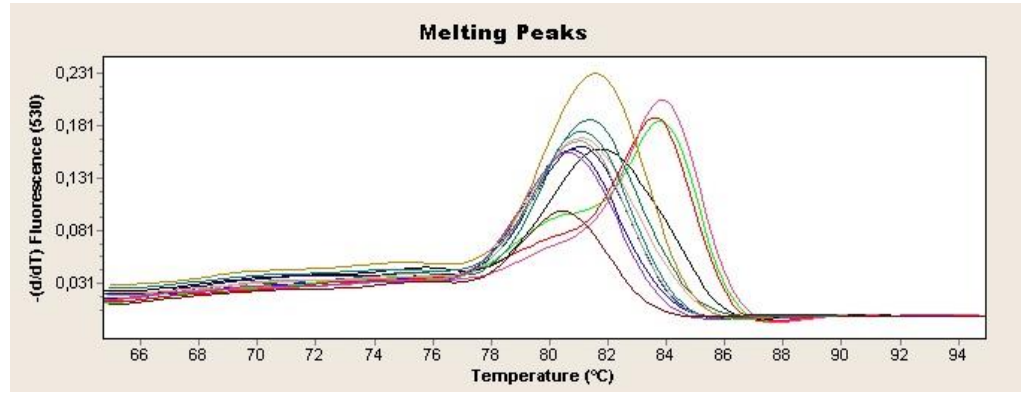
SYBR Green ile yapılan PCR reaksiyonunda, *C. albicans* ve *C. krusei* ile enfekte DH' lerde %90 oranında TLR4 ifadenmesinde pozitiflikler tespit edilmiştir (Şekil 29).



Şekil 29: TLR4 ifadenmesinin Real-time PCR ile gösterilmesi

4. 4. c. TLR6 İfadelenmesi

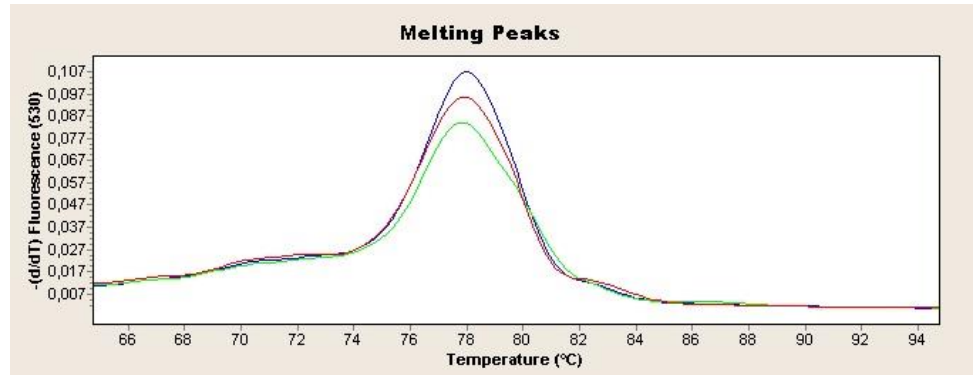
SYBR Green ile yapılan PCR reaksiyonunda, *C. albicans* ve *C. krusei* ile enfekte DH' lerde %90 oranında TLR6 ifadenmesinde pozitiflikler belirlenmiştir (Şekil 30).



Şekil 30: TLR6 ifadenmesinin Real-time PCR ile gösterilmesi

4. 4. d. CCR5 İfadelenmesi

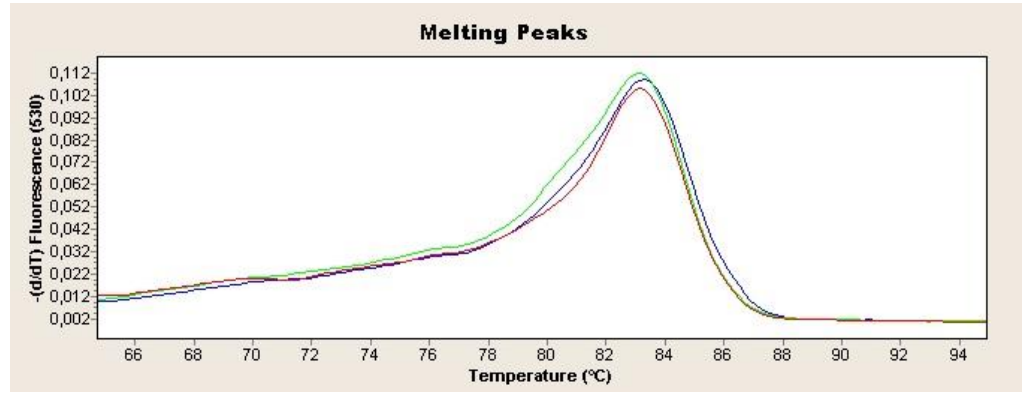
SYBR Green ile yapılan PCR reaksiyonunda, *C. albicans* ve *C. krusei* ile enfekte DH' lerin tamamında CCR5 ifadelenme pozitiflikleri belirlenmiştir (Şekil 31).



Şekil 31: CCR5 ifadelenmesinin Real-time PCR ile gösterilmesi

4. 4. e. CXCR4 İfadelenmesi

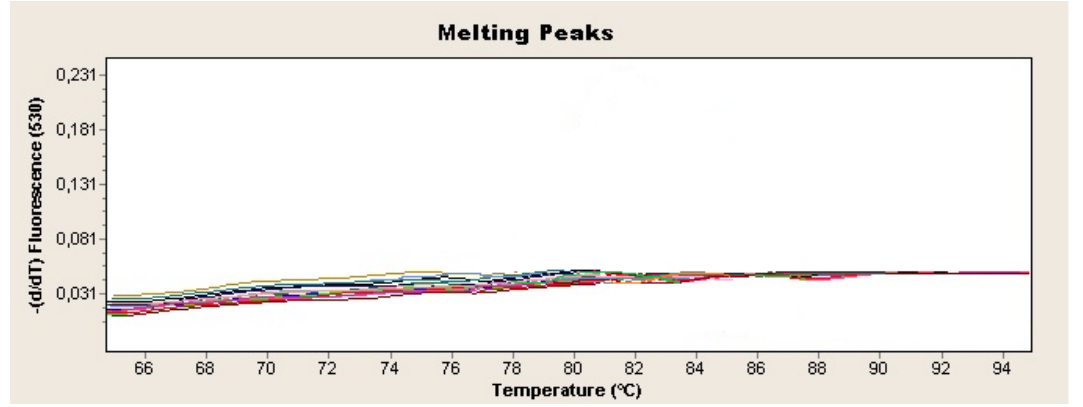
SYBR Green ile yapılan PCR reaksiyonunda, *C. albicans* ve *C. krusei* ile enfekte DH' lerde CXCR4 ifadelenmesinde %90 oranında pozitiflik saptanmıştır (Şekil 32).



Şekil 32: CXCR4 ifadelenmesinin Real-time PCR ile gösterilmesi

4. 4. f. CX3CR1 İfadelenmesi

SYBR Green ile yapılan PCR reaksiyonunda, *Candida* türleri ile enfekte kuyucuklarda ve kontrol kuyucuklarında CX3CR1 ifadenmesi gözlenmemiştir (Şekil 33).



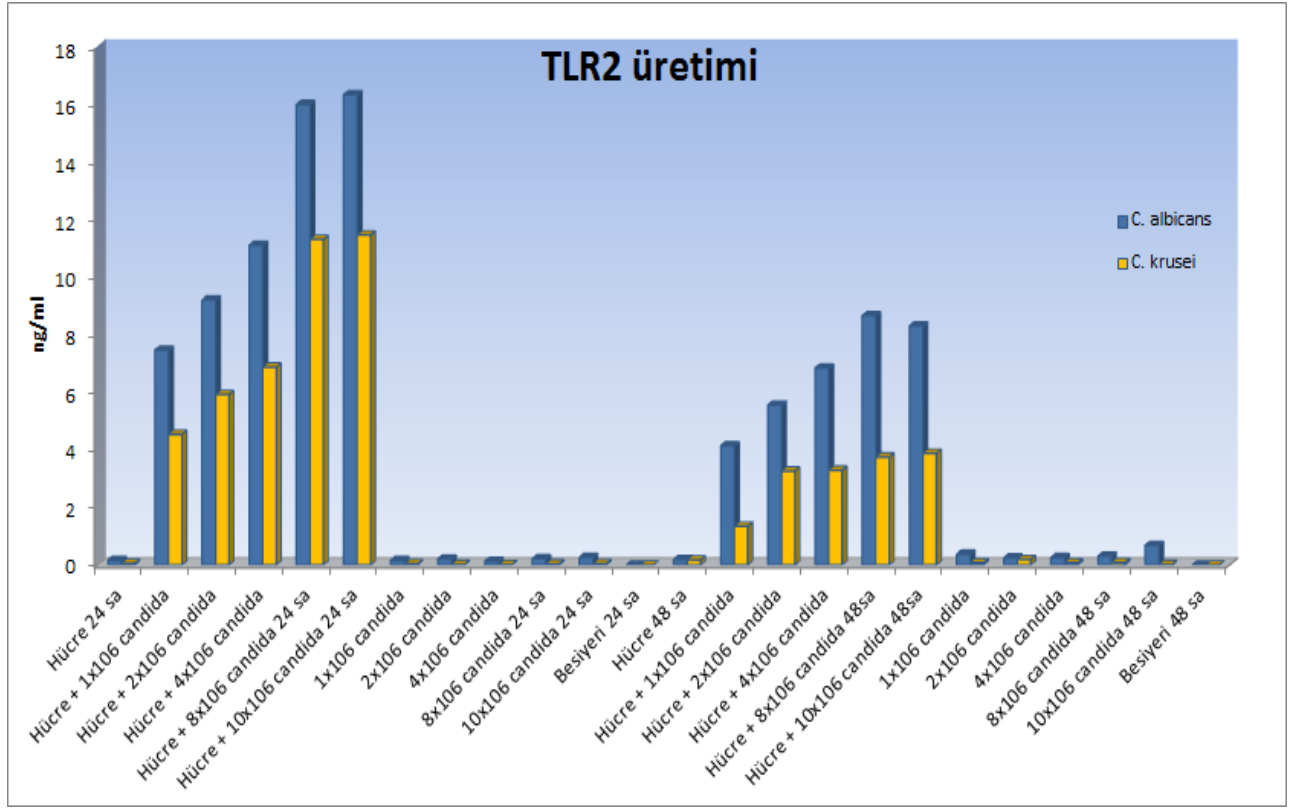
Şekil 33: CX3CR1 ifadenmesinin Real-time PCR ile gösterilmesi

4. 5. DH Kùltùrlerinde TLR ve Kemokin Üretimi ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

4. 5. a. TLR2 üretimi

Çeşitli oranlarda *C.albicans* ve *C. krusei* suşları ile uyarılmış DH'ler, 24. ve 48. saatlerde kontrol kuyucuklarına göre TLR2 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artışa neden olmuştur ($p<0.05$) ($p=0.0252$).

C. albicans *C. krusei*' ye oranla daha fazla TLR2 ekspresyonunu sağlamıştır. Her iki maya için de 24. saatte, 48. saate kıyasla daha fazla TLR2 üretimi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, artan maya sayısı hücrelerden daha fazla TLR2 üretimine neden olduğu görülmüştür (Grafik 1).

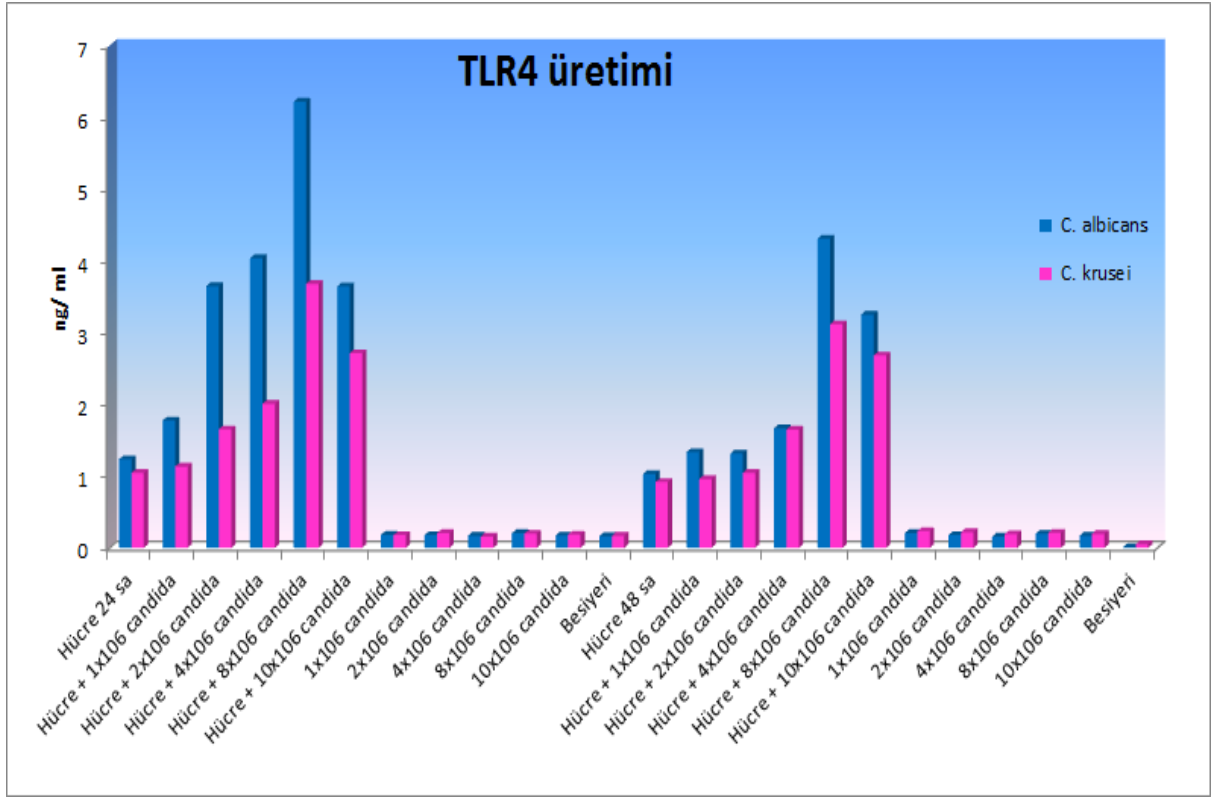


Grafik 1: *C. albicans* ve *C. krusei* ile inkübe edilen DH' lerdeki TLR2 üretimi

4. 5. b. TLR4 üretimi

Çeşitli oranlarda *C.albicans* ve *C. krusei* suşları ile uyarılmış DH'ler, 24. ve 48. saatlerde kontrol kuyucuklarına göre TLR4 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artışa neden olmuştur ($p<0.05$) ($p=0.0292$).

C. albicans *C. krusei*' ye oranla daha fazla TLR4 ekspresyonunu sağlamıştır. Her iki maya için de 24. saatte, 48. saate kıyasla daha fazla TLR4 üretimi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, artan maya sayısı hücrelerden daha fazla TLR4 üretimine neden olduğu görülmüştür (Grafik 2).

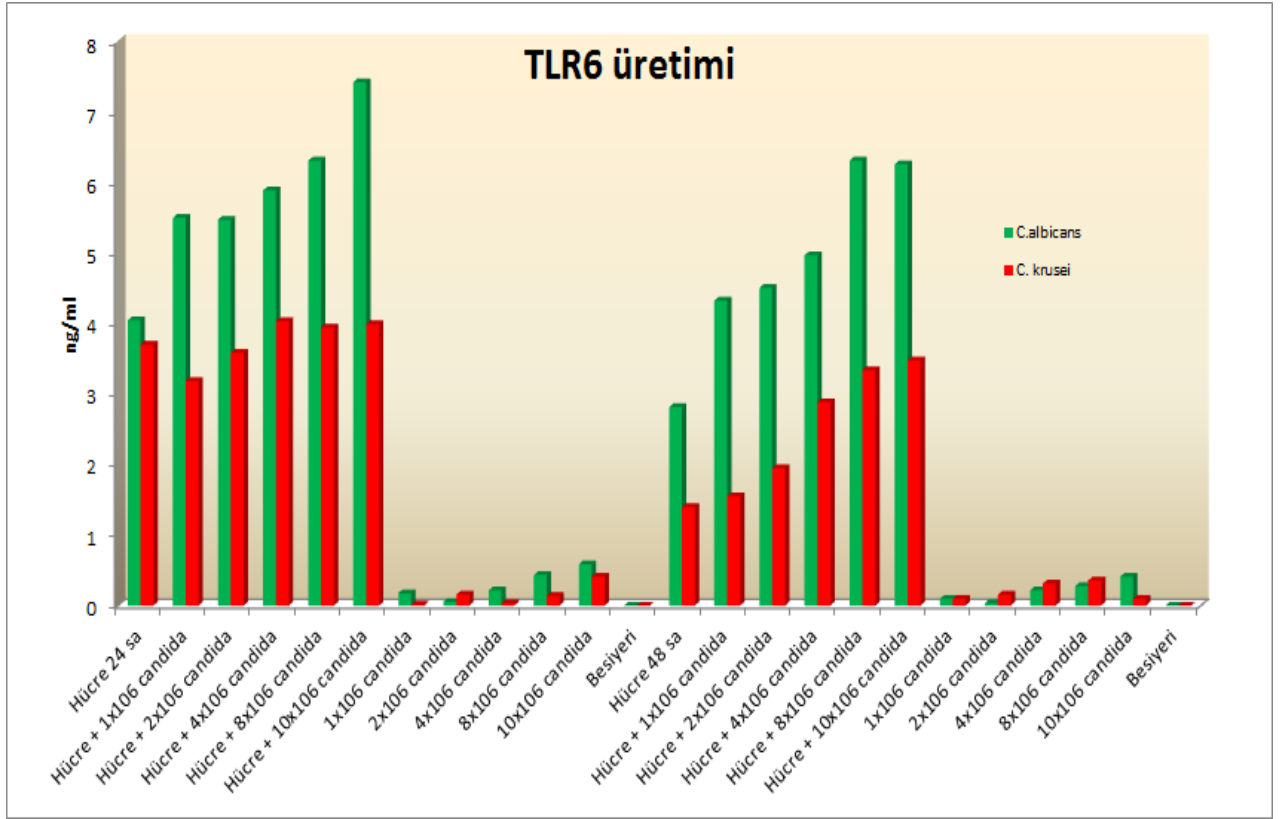


Grafik 2: *C. albicans* ve *C. krusei* ile inkübe edilen DH' lerden TLR4 üretimi

4. 5. c. TLR6 üretimi

Çeşitli oranlarda *C.albicans* ve *C. krusei* suşları ile uyarılmış DH'ler, 24. ve 48. saatlerde kontrol kuyucuklarına göre TLR6 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artışa neden olmuştur ($p \leq 0.05$) ($p=0.050$).

C. albicans *C. krusei*' ye oranla daha fazla TLR6 ekspresyonunu sağlamıştır. Her iki maya için de 24. saatte, 48. saate kıyasla daha fazla TLR6 üretimi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, artan maya sayısı hücrelerden daha fazla TLR6 üretimine neden olduğu görülmüştür (Grafik 3).

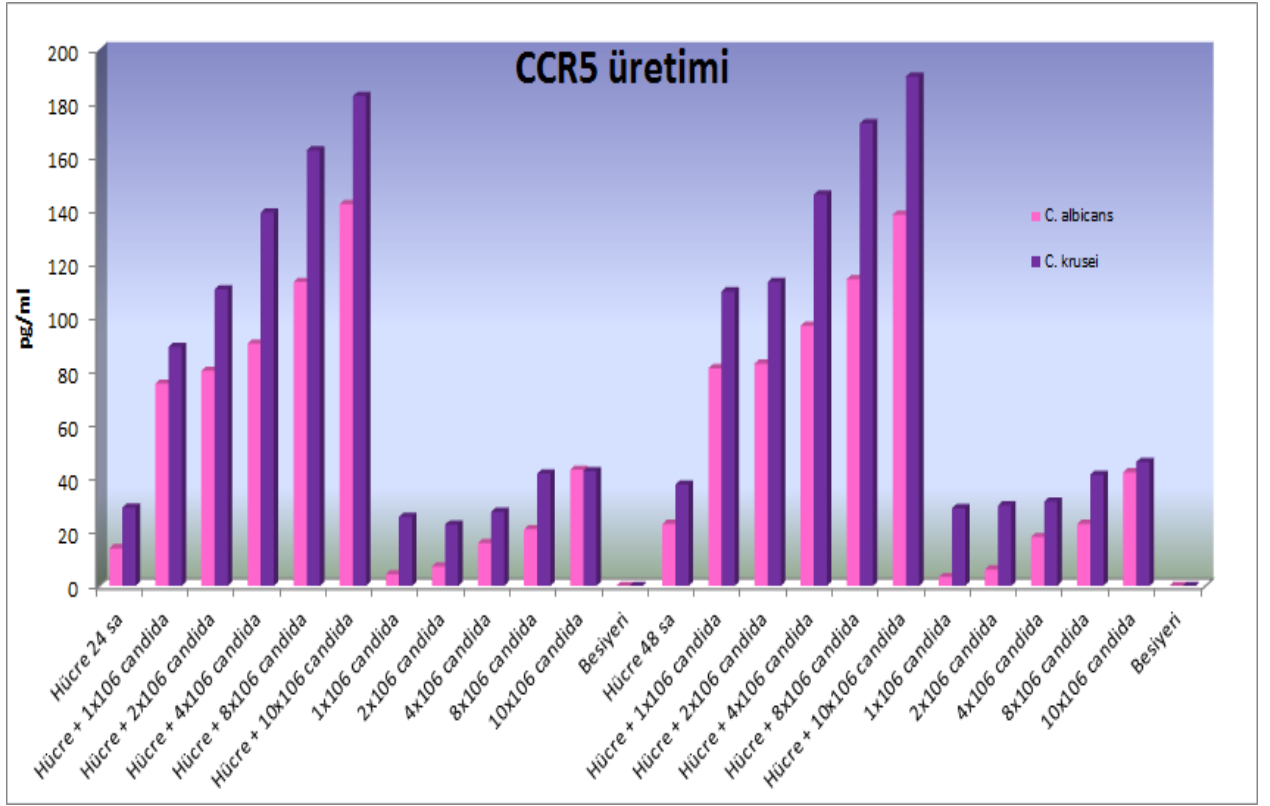


Grafik 3: *C. albicans* ve *C. krusei* ile inkübe edilen DH' lerden TLR6 üretimi

4. 5. d. CCR5 üretimi

Çeşitli oranlarda *C.albicans* ve *C. krusei* suşları ile uyarılmış DH'ler, 24. ve 48. saatlerde kontrol kuyucuklarına göre CCR5 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artışa neden olmuştur ($p<0.05$) ($p=0.0003$).

C. krusei, *C. albicans'* a oranla daha fazla CCR5 ekspresyonunu sağlamıştır. Her iki maya için de 24. sa ve 48. sa birbirine yakın seviyelerde CCR5 üretimi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, artan maya sayısı hücrelerden daha fazla CCR5 üretimine neden olduğu görülmüştür (Grafik 4).

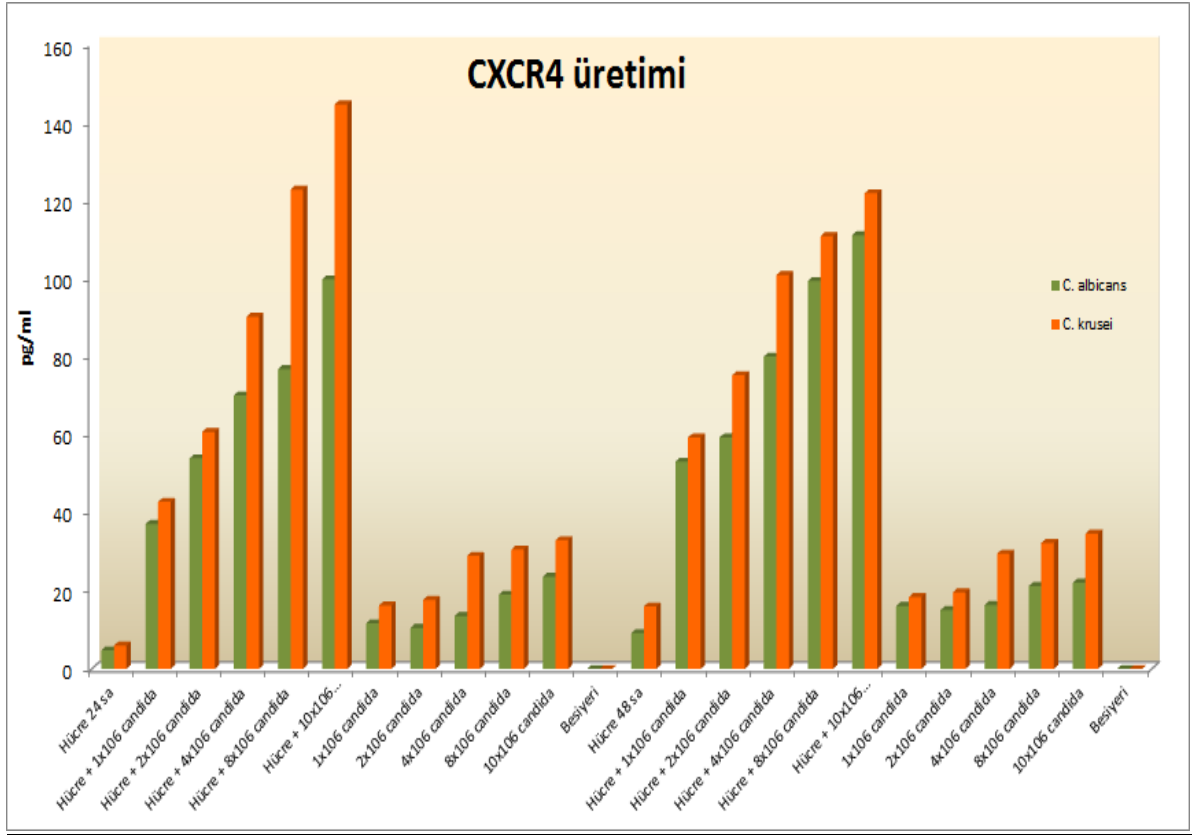


Grafik 4: *C. albicans* ve *C. krusei* ile inkübe edilen DH'lerden CCR5 üretimi

4. 5. e. CXCR4 üretimi

Çeşitli oranlarda *C.albicans* ve *C. krusei* suşları ile uyarılmış DH'ler, 24. ve 48. saatlerde kontrol kuyucuklarına göre CXCR4 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artışa neden olmuştur ($p<0.05$) ($p=0.0008$).

C. krusei, *C. albicans*' a oranla daha fazla CXCR4 ekspresyonunu sağlamıştır. Her iki maya için de 24. sa ve 48. saatte birbirine yakın seviyelerde CXCR4 üretimi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, artan maya sayısı hücrelerden daha fazla CXCR4 üretimine neden olduğu görülmüştür (Grafik 5).

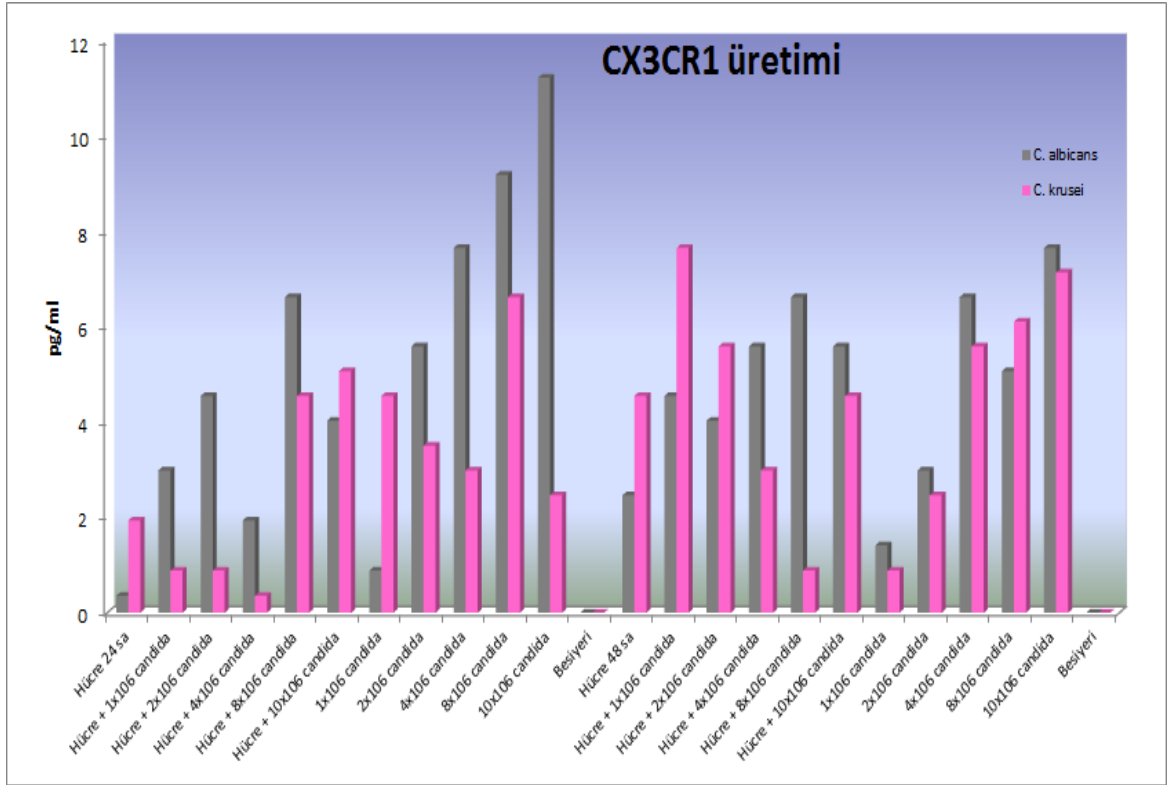


Grafik 5: *C. albicans* ve *C. krusei* ile inkübe edilen DH' lerden CXCR4 üretimi

4. 5. f. CX3CR1 üretimi

Çeşitli oranlarda *C.albicans* ve *C. krusei* suşları ile uyarılmış DH'ler, 24. ve 48. saatlerde kontrol kuyucuklarına göre CX3CR1 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artışa neden olmamıştır ($p>0.001$) ($p=0.3608$).

C. krusei ve *C. albicans* birbirine benzer oranlarda CX3CR1 ekspresyonunu sağlamıştır. Her iki maya için de 24. sa ve 48. saatte birbirine yakın seviyelerde CX3CR1 üretimi olduğu belirlenmiştir (Grafik 6).



Grafik 6: *C. albicans* ve *C. krusei* ile inkübe edilen DH' lerden CX3CR1 üretimi

5. TARTIŞMA

Günlük yaşamda insan derisi ve mukozası, sayısı bilinmeyecek çoklukta fungal sporlarla karşılaşmaktadır. Bugün itibariyle, 100.000' den fazla fungal tür olduğu bilinmektedir. Fungal ajanlar insanda; basit kolonizasyondan, yüzeysel deri ve mukoza enfeksiyonuna, alerjiden hayatı tehdit edecek şiddette sistemik enfeksiyonlara kadar geniş bir yelpazede hastalıklar oluşturabilmektedir. Fungal bir hastalık; ajanın deri veya mukozadan girişi, konakçı dokuya tutunması, çoğalması ve bazen de dissemine olması şeklinde oluşmaktadır. Normal şartlarda zararsız olan; *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* gibi ajanların oluşturduğu hastalıklar, bazen ciddi morbidite ve mortalite sebebi olabilmektedir.

Son yıllarda tıbbi girişimlerin artışı çeşitli hasta gruplarının mantar enfeksiyonlarına yatkınlığını arttırmıştır. Bağışıklık sistemi, organ transplantasyonu, antibiyotik kullanımı, AIDS gibi nedenlerle baskılanmış bireylerde mantar enfeksiyonları ciddi sorunlar oluşturabilmektedir ⁷⁷. Hastane kaynaklı kandidemi yaklaşık olarak hastane kaynaklı enfeksiyonların %10-15' ini oluşturur. Son yıllarda mantar enfeksiyonları önemli hale gelmiştir ^{3,77}. Amerika' da, nozokomiyal enfeksiyonlar arasında 4. sırada yer alan kandideminin %33 mortal seyrettiği bildirilmiştir ⁸².

Fungal enfeksiyonların tanısı, tedavide izlenecek yolun belirlenmesi açısından kritik öneme sahiptir. Mantar enfeksiyonlarının tanısı, klasik olarak kültürden etkenin izolasyonu ve tanımlanması, serolojik olarak mantar ürünlerinin gösterilmesi, histopatolojik preparatlarda mantarlara ait hiflerin veya hücrelerin görülmesi, radyolojik olarak özgül görüntülerin saptanması eşliğinde klinik bulgular ile konmaktadır ^{2,72}. Moleküler yöntemler, yüksek özgüllük ve duyarlılıkları ile son yıllarda bütün enfeksiyon hastalıklarında olduğu gibi, mantar enfeksiyonlarında da tanı koydurucu avantajlar sunmaktadır. Özellikle kültürde üretilmeyen

etkenlerin moleküler yöntemler kullanılarak gösterilmesi tanıda önemli avantajlar getirmiştir. Etken kültürde üretilse bile tür tanımı yapılması için moleküler yöntemlerden faydalanılabilir ^{2,72,78}.

Derin dokularda enfeksiyon oluşturan mantarların kültürden izolasyonu genellikle %50 başarı ile mümkün olmaktadır ^{2,72}. Bu nedenle mantar enfeksiyonlarının tanısı; genellikle histopatolojik preparatlarda görülen nonspesifik mantar elemanları ve serolojik; radyolojik indirekt tanı yöntemlerinin desteklediği klinik tanıda kısıtlı kalmaktadır. Pek çok olguda tür, hatta cins tanımı yapılamamaktadır. Farklı etkenlerin neden olduğu mantar enfeksiyonları klinik veya radyolojik olarak birbirinden ayıramayabilir. Bu açıdan bakıldığında mantarların en azından cins düzeyinde tanımlanmaları gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Moleküler yöntemler diğer tanı yöntemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda, bu gerekliliğe cevap verebilecek geniş olanaklar sunmaktadır ⁷⁷.

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

Candida' ya karşı gelişen bağışık yanıtın bütün ayrıntıları tam olarak açıklanmamış olmakla birlikte, doğal ve kazanılmış bağışıklık sisteminin birlikte bu savunmada rol aldığı bilinmektedir. Mantar enfeksiyonlarında konağın bağışık durumunun çok önemli olduğunu vurgulamak gerekir. Çünkü son yıllarda mantar enfeksiyonlarında görülen artışlar, özellikle bağışıklık sistemi çeşitli sebeplerle baskılanmış veya zayıflatılmış hastalarla ilişkilidir ^{1,19}.

Doğal bağışıklık, enfeksiyonun erken dönemlerinde gelişir ve ökaryotik organizmalara karşı korunmada etkindir. Çeşitli uyaranlar

aracılığı ile aktiveleşen immün yanıt hücreleri “kemokin” olarak tanımlanan ve enfeksiyon, travma, inflamasyona karşı konak yanıtını düzenleyen polipeptitler üretir. Doğal bağışıklık, kemokin gibi aracı moleküller kullanarak antijen tanınması ve sunumunu gerçekleştirir. Mikroorganizmalar vücuda girdiklerinde ilk olarak, anatomik ve fiziki bariyerler, normal flora ve savunma sistemleri (defensinler gibi) ile karşılaşır. Bu basamakları geçebilen mikroorganizmalar, fagositik hücreler ve antijen sunucu hücrelere maruz kalır; böylece doğal bağışıklık mekanizması tamamlanır^{4,5,19}.

C. albicans enfeksiyonuna karşı doğal antifungal savunma mekanizmaları hücreler, hücresele reseptörler ve çok sayıda humoral faktör aracılığı ile gerçekleşmektedir. *Candida* enfeksiyonlarına karşı savunmada mononükleer ve PMNL (polimorfonükleer lökositler) gibi fagositer sistem hücreleri, antijen sunucu hücreler (ASH) tarafından oluşturulan hücresele yanıt çok önemlidir. Bu hücreler oksidatif ve nonoksidatif mekanizmalarını kullanarak *Candida*’ların hücre içi ve hücre dışı ortamda öldürülmesine katkıda bulunur. Ayrıca ASH’ler, mikroorganizmayı işleyerek Th hücrelerine sunar ve kazanılmış bağışıklık yanıtının başlatılmasında rol oynar. Aynı zamanda ASH’lerden salınan glikoproteinler (kemokin gibi) aracılığı ile de bağışıklık sisteminin farklı basamaklarını etkilenir.

Makrofaj, nötrofil ve DH’ler gibi doğal immün sistemin bir parçası olan fagositer hücreler nonspesifik immün efektörlerdir. Bu paradigma, TLR’ler gibi patojen tanıyan reseptörlerin (PRR) keşfedilmesi ile aydınlatılmaya başlanmıştır. Bu grupta yer alan reseptörler, patojenle ilişkili moleküler kalıpları (PAMP) tanıyarak konak ile antijen ayrımının sağlanmasını gerçekleştirir. Bu grupta yer alan reseptörler mantarlarda β -glukan, kitin, mannoprotein gibi yapısal özellikleri tanıyarak immün yanıtın gelişmesine katkıda bulunurlar^{21,22}.

PRR’ler aynı tür etkeni tanıırken dahi birden fazla reseptör kullanılabilir. *C. albicans*’ın tanınmasında TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 ve

TLR9' un görev aldığı ve her bir reseptörün mayanın farklı yapısal bölgelerini tanıdığı belirlenmiştir. Mayanın hücre duvar componentlerinden biri olan β -glukanın TLR' lerce tanınmasının ardından DH tarafından sitokinlerin salınmaya başladığı, fungisidal reaktif oksijen yolağının (ROS) başladığı, T hücrelerin uyarılması ile kazanılmış immün yanıtın aktive olduğu bilinmektedir ⁷⁸.

Yaptığımız çalışmada, *Candida* enfeksiyonu sırasında görülen TLR ve kemokin profillerindeki değişikliklerin belirlenmesi amacıyla, invitro olarak *Candida* türleri ile enfekte edilmiş dendritik hücre kültüründe TLR2, TLR4, TLR6, CX3CR1, CXCR4, CCR5 ifadelenmesi incelenmiştir. Elde edilen veriler kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Daha önce yapılan çalışmaların çoğu, nötrofil, monosit/makrofajların *Candida* ile uyarıldığında çeşitli moleküllerin incelenmesi veya hayvan deney modellerinde *Candida* enfeksiyonlarında bu moleküllerin düzeylerinin araştırılması üzerine yoğunlaşmıştır. Çalışmamız, enfeksiyon modelinin ASH' lerden profesyonel olarak antijenle ilişkili hücre olan DH' ler üzerine olması ve TLR ve kemokin reseptörlerinin ifadelenmesinin birlikte incelenmesi açısından diğer çalışmalardan farklı bir özellik sergilemektedir.

Çalışmamızda incelediğimiz, 14 kontrol kuyucuğunun hiçbirinde (0/14), 10 enfekte kuyucukların tamamında (10/10) TLR2' nin 350 baz çiftlik ürünü elde edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda *C. albicans* ve *C. krusei* suşları ile uyarılmış DH' ler, 24. ve 48. saatlerde sadece maya içeren, sadece DH içeren veya sadece besiyeri içeren kontrol kuyucuklarına göre TLR2 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artışa neden olmuştur ($p= 0.0252$). *C. albicans*, *C. krusei*' ye oranla daha fazla TLR2 üretimi sağlamıştır. Her iki maya için de 24. saatte, 48. saate kıyasla daha fazla TLR2 üretimi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, artan maya sayısı hücrelerden daha fazla TLR2 üretimine neden olduğu görülmüştür.

Candida ve TLR ilişkisi açısından yapılan çalışmalarda TLR2' nin bloke edilmesi sonucu, *C. albicans* ile monositlerin stimülasyonu sonucu TNF ve IL-1 salımında artış olduğu belirlenmiştir. Daha sonra TLR2 defektli farelerde yapılan deneylerde, bu tür farelerde sistemik *Candida* enfeksiyonuna duyarlılığın arttığı gözlemlenmiştir. Enfeksiyona karşı duyarlılığın artması TLR2 ile IL-10 etkileşiminin bir sonucu olduğu düşünülmektedir ^{10,19}.

TLR2, *C. albicans* fosfolipomannanını tanıma özelliğine sahiptir. Plaine ve ark. TLR2 ve TLR4 defektli fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, konak immün yanıtında meydana gelen değişimleri tanımlamaya çalışılmıştır. Bu amaçla oluşturdukları kandidoz modelinde, nötrofil ve makrofajları toplayarak invivo ve invitro yanıtları değerlendirilmiştir. Çalışmalarının sonucunda, TLR' lerin sitokin üretimini artırarak *Candida*' ya karşı konağı koruduğu görülmüştür ⁷⁹.

Candida enfeksiyonuna karşı immün yanıtta farklı immün hücreler rol oynayabilir. Bunlardan biri de doğal immün yanıtın primer hücrelerinden olan nötrofillerdir. van Bruggen ve ark.' nın deneyinde IRAK-4 defektli nötrofillerin çeşitli mikroorganizmaları öldürme ve yanıt yetenekleri değerlendirilmiştir. Nötrofillerin mikroorganizma yok etme yeteneklerinin TLR aracılı tanıma mekanizmalarından bağımsız olduğu belirlenmiştir. Ayrıca IRAK-4 eksikliğinin yaşla beraber ortaya çıktığı ve bu nedenle de TLR bağımlı mekanizmaların genç bireylerde kazanılmış immün yanıtta görev aldığı söylenmektedir ⁸⁰.

Mantarların çeşitli hücre duvarı bileşenleri ile konak immün yanıtı iletişim halindedir. DH' ler ise T hücre bağımlı immün yanıtının orkestra şefidir. Pietrella ve ark.' nın çalışmasında, DH ile *C. albicans*' a ait mannoprotein etkileşimi analiz edilmiş. Araştırmacılar, mannoprotein DH' leri stimüle ederek DH' lerden çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin etkileşimin ilk 6. saatinden itibaren salınmaya başladığı, ayrıca artan kostimülatör proteinler sayesinde DH' lerin maturasyonunun indüklendiğini

belirlemişlerdir. *Candida* mannoproteini ile DH etkileşiminin geç dönemlerinde ise TLR2 ve TLR4 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Bu verilere göre araştırmacılar, DH' lerin mannoproteine karşı yanıtının *Candida*' ya karşı aşı çalışmalarının ilk basamağı olabileceğini belirtmişlerdir ⁸¹.

C. albicans' ın yapısal komponentleri ile immün hücreler arasındaki etkileşimi açıklamak adına yapılan çalışmalardan biri de Min ve ark. larına aittir. Bu çalışmada, insan monositik lösemi hücrelerinden (THP-1) oluşan hücre kültürü ile *C. albicans*' ın β - glukanının invitro kültürü değerlendirilmiştir. Maya komponenti ile uyarılan hücrelerde RT-PCR sonuçlarına göre, proinflamatuvar sitokin (TNF- α), kemokin (IL-8), dektin artışı gözlemlenirken, TLR2 mRNA seviyelerinin değişmediği belirlenmiştir. Aynı zamanda, β -glukanın NF-kB aktivasyonuna neden olduğu görülmüştür. Araştırmacılar, insan THP-1 monosit hücreleri üzerinde mayanın TLR2 aktivasyonuna neden olmadığını, Dektin-1 ile uyarılan farklı bir yolak sayesinde mayaya karşı yanıt oluşturulduğunu söylemektedir ⁸².

TLR ve *Candida* birlikteliğine ait çalışmalardan biri de van der Graaf ve ark. tarafından yapılmıştır. Deneyde, *Candida* konidya ve hif yapısının konakta farklı bir uyarım yapıp yapmadığı araştırılmıştır. Çalışmanın verilerine göre, invivo ve invitro denemelerde, blastokonidyanın hem TLR2, hem de TLR4' ü stimüle ederken, hifin TLR4 tarafından tanınmadığı, hifin sadece TLR2 yanıtını artırdığını, bu sayede de hifin immün yanıttan kaçabildiğini söylemektedirler. *Candida* stimülasyonunun ardından TLR4' ün proinflamatuvar sitokin, TLR2' nin ise antiinflamatuvar sitokin salınımına neden olduğu belirlenmiştir ⁸³.

TLR' lerin keşfedilmesi, mikrobiyal enfeksiyonlara yanıtın detaylandırılmasına ve bu konuya ait yeni pencerelerin açılmasına neden olmuştur. Villamon ve ark., TLR2 defektli farelerde yaptıkları çalışmada, TLR2' nin *Candida*' ya karşı koruyucu yanıtta kilit noktalarından biri

olduğunu göstermektedir. TLR2 defektli farelerde, vahşi tipe göre kandidoz sonrasında yaşam süresinin, salınan proinflatuvar sitokin miktarları ile fagositer hücrelerin mayayı öldürme kapasitelerinin azaldığı görülmüştür⁸⁴.

Woehrle ve ark. *Candida* ve Gr (+) mikroorganizmalar nedeniyle sepsis gelişen hastalara yönelik yaptıkları çalışmalarda, TLR2 varlığını PCR ve flow sitometri yöntemleri kullanarak farklı immün hücrelerde göstermişlerdir. Araştırmacılar, TLR genotiplendirilmesinin, başta *Candida* olmak üzere birçok mikroorganizmaya karşı konak immün yanıtını artırıcı önlemlerle değiştirilebileceğinin önemini vurgulamaktadır⁸⁵.

TLR2' nin immün sistem cevabının düzenlenmesinde farklı görevler de üstlendiği bilinmektedir. Sutmuller ve ark.'nın yaptığı çalışmaya göre, TLR2' nin *Candida* enfeksiyonunun ilk aşamasından başlamak üzere immün yanıtı yönlendirdiği bildirilmektedir. TLR2 defektli farelerde yapılan deneylerinde, TLR2' nin *C. albicans*' ı tanımada ve özellikle Treg hücrelere yön vererek immün yanıtı oluşturduğu belirlenmiştir. Enfeksiyon öncesi dönemde, olmayan veya düşük seviyelerde üretilen TLR2 sayesinde Treg' ler, immün sistem üzerinde baskılama yaparken, enfeksiyon sırasında bu baskılanma fonksiyonunu artan TLR2 ligandlarının uyarımı ile sağlamaktadır. Ayrıca enfeksiyon sırasında Treg hücrelerin uyarılması da T hücre proliferasyonunu artırmaktadır. Enfeksiyon sonrasında ise, TLR2 ligandının azalması ile birlikte Treg hücreler immün sistemi baskılamaya devam etmektedir⁸⁶.

Megias ve ark. yaptığı çalışmalarda *C. albicans* enfeksiyonunun progenitör immün hücreler üzerine etkilerini değerlendirilmiştir. Özellikle TLR2 aracılı doğal immün yanıtın *C. albicans*' a karşı savunmayı artırdığını, immün hücrelerin TLR2 aracılığıyla mayayı ortadan kaldırmaya yönelik sayılarının ve salgılarının arttığını göstermişlerdir. Ayrıca TLR2 defektli farelerde, mayanın fagosit edilemediğini, vahşi tip farelerde ise

TLR2 aracılı tanındığı ve DH' ler tarafından mayanın fagosite edilip TNF- α sekresyonunun artmasıyla mayanın ortadan kaldırıldığı belirlenmiştir ⁸⁷.

Chen ve ark. *Candida* immünolojisi konusundaki deneylerinde, *Candida* fosfolipomannanını invitro olarak DH' ler üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Western blot yöntemiyle baktıkları TLR2 ekspresyonunun *Candida* - hücre birlikteliğiyle arttığını, TLR4 yanıtının değişmediği belirtilmiştir. Bu çalışmada, TLR2 yanıtının *Candida* enfeksiyonu sırasında inflamatuvar yanıtta katkıda bulunduğu tanımlanmaktadır ⁸⁸.

Çalışmamızda TLR2 ifadelenmesinin kandidoz oluşturulmuş deney gruplarında daha fazla olduğu görülmüştür (p=0.0252). Bu sonuç yukarıda belirtilen birçok çalışmanın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Yapılan birçok invivo ve invitro çalışmalarda *Candida*' nın TLR2 salınımını uyardığı gösterilmiştir.

Murciano ve ark. TLR2 ve TLR4 defektli farelerin peritoneal makrofajları ile dalak hücrelerinin *C. albicans* stimülasyonuna nasıl yanıt verdiklerini araştırdıkları çalışmalarında, TLR2' nin TNF- α , IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokin salınımını artırdığını görmüşlerdir. Buna karşın TLR4' ün TLR2 ile kıyaslandığında *C. albicans*' a karşı çok net bir rolünün olmadığı belirtilmektedir ⁸⁹.

Patojenle ilk karşılaşmada bariyer görevini üstlenen keratinositler, ürettikleri antimikrobiyal maddeler aracılığıyla patojeni öldürme özelliğine sahiptir. Pivarcsi ve ark. yaptığı deneyde, insan keratinositlerini *Candida* ile invitro koşullarda kültüre alıp hücrelerin cevabını aydınlatmaya çalışmışlardır. Zamana bağlı olarak keratinositlerin öldürme yeteneklerinin ve reseptör sayısının arttığını belirlemişler. Deneylerinde TLR2 ve TLR4' ün epidermal keratinositlerden ifadelenildiğini ve diğer sitokin ile kemokinlerin salınımını sağladığını belirtmektedir ⁹⁰.

Çalışmamıza benzer olarak yapılan çalışmalardan biri de Bellocchio ve ark tarafından yapılmıştır. Araştırmacıların fungal enfeksiyonlarda rol alan ilk hücrelerden biri olan nötrofillerin etkilerini araştırmayı amaçladıkları çalışmalarında, *Aspergillus fumigatus*' un çeşitli yollarla aktive ettiğini göstermişlerdir. Mantar ile karşılaşma sonrasında ilk olarak TLR2 aktivasyonu, bunu takiben TLR4 aktivasyonu ve kaskad şeklinde ilerleyen TLR3, 5, 7, 8, 9 aktivasyonu olduğu, nötrofillerde patojeni öldürmeye yönelik çeşitli enzimlerin yapımının hızlandığı, apoptozisin başlayarak çeşitli sitokinlerin üretiminin de arttığı, buna dayanarak nötrofillerin fungal enfeksiyonlara karşı yanıtı primer olarak yönlendirdiği bildirilmektedir ⁹¹.

Candida' nin konakçıda oluşturduğu değişiklikleri araştırmak için yapılan deneylerden biri de Yuan ve ark.' na aittir. Deneysel olarak TLR2 ve TLR4 defektli farelerin kullanıldığı çalışmada, keratit modelindeki değişimler incelenmiştir. Enfeksiyonun oluşumundan 1 hafta sonra kontrol grubuyla kıyaslanınca TLR2' nin belirgin olarak arttığını, bu artışı takiben TLR4' ün arttığını, bu oluşumu sırasıyla TNF- α , IL-23, CCR3 ve CCR4' ün izlediği belirtilmektedir. Araştırmacılar, TLR6' da bir değişim olmadığını gözlemlemiştir. Çalışmaya göre, TLR2' nin *Candida* keratiti sırasında fungal büyümeyi kontrol altına alacak proinflamatuvar sitokin üretimine sinyal oluşturduğunu belirtmektedir ⁹².

Çalışmamızda enfekte grupta TLR2 oranı kontrol grubuna göre fazla olduğu, zamana bağlı olarak TLR2 ifadenmesinin arttığı görülmektedir. Bu sonuç, hücrelerin zamana bağlı antijeni tanımayı artırarak aktive olduğunu göstermektedir. İlk tanımayı sağlayan TLR2' nin, diğer reseptörlerin de benzer şekilde aktivasyonuna neden olduğu görülmüştür.

Çalışmamızın verilerine göre, 14 kontrol grubundan 1' inde (1/14), 10 enfekte grubun 9' unda (9/10) TLR4' e ait 500 baz çiftlik ürün elde edilmiştir. Çeşitli oranlarda *C.albicans* ve *C. krusei* suşları ile uyarılmış

DH' ler, 24. ve 48. saatlerde kontrol kuyucuklarına göre TLR4 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artışa neden olmuştur ($p=0.0292$). Ayrıca, *C. albicans* *C. krusei*' ye oranla daha fazla TLR4 sekresyonu sağlamıştır. Her iki maya için de 24. saatte, 48. saate kıyasla daha fazla TLR4 üretimi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, artan maya sayısının hücrelerden daha fazla TLR4 üretimine neden olduğu görülmüştür.

İlk bulunan ve üzerinde çok sayıda çalışma yapılan TLR4' ün temel işlevi bakteriyel lipopolisakkaritleri tanımadır. Bu görevine ek olarak TLR4, *S. cerevisiae* ve *C. albicans*' a ait mannanları da tanıyabilme özelliğine sahiptir. TLR4 ve mannan bağlantısı çok sayıda proinflatuvar sitokinin aktivasyonu ile sonuçlanır. TLR4 defektli farelerde yapılan deneyde, farelerin *Candida* enfeksiyonuna yatkınlıklarının arttığı belirlenmiştir. Bu sonucu enfeksiyonun ardından ASH' lerde kemokin salınımının azalmasının takip ettiği görülmüştür⁹³.

TLR4' ün bakteriyel tanıma işlevinin yanı sıra *C. albicans* için önemli bir tanıma reseptörü olduğunu belirten çalışmalardan biri de Chantal ve ark. tarafından yapılmıştır. Çalışmada, TLR4 polimorfizmlerinin *Candida* enfeksiyonlarına yatkınlığına etkileri araştırılmıştır. Kandidemili hastalardan alınan örneklerde TLR4 gen defektleri olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, bu eksikliğin de kandidemiye duyarlılığı artırdığı, ayrıca artan IL-10 seviyesinin kandidemiye tetiklediğini savunmaktadır⁹⁴.

Çalışmamızda ise, yukarıdaki çalışmalara benzer olarak kontrol kuyucuklarını ile karşılaştırıldığında, DH' lerden ifadelenen TLR4 yanıtının mayalarla etkileşim sonucunda arttığı tespit edilmiştir. Bu yanıtın ilk 24. saatte, 48. saate oranla daha fazla üretimi TLR4' ün mayanın DH' ler tarafından ilk tanınması sırasında aktive olduğunu göstermektedir.

TLR4' ün fungal enfeksiyonlardaki yerini belirlemeye çalışan araştırmalardan biri de Nakamura ve ekibi tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar, TLR2 ve TLR4 defektli farelerden aldıkları kemik iliği kökenli

DH' ler ile *Penicillium marneffei* kültüründe oluşan değişimleri incelemişler. Araştırmacılar, TLR2 ve dektin 1' in tanımada görev aldığını, TLR4' ün fungal tanımada işlevinin olmadığını bildirmektedirler ⁹⁵.

C. albicans' in çeşitli duvar komponentleri immün sistemi direk olarak uyarıcı niteliktedir. Mannoz rezidüleri yönünden defektif suşların, insan mononükleer hücreler ile fare makrofajlarında daha az sitokin üretimine neden olduğu, daha az uyarılan TLR2 ve TLR4 reseptörlerinin mayayı tanımada yetersiz kaldığı bildirilmiştir. Çalışmada monosit/makrofajların *C. albicans*' in çeşitli hücre duvar komponentlerini tanıyarak aktive oldukları gösterilmektedir ⁹⁶.

2009 yılında Gil ve ark. tarafından yapılan çalışmada, *C. albicans*' a karşı oluşturulan immün yanıtta TLR2 ve TLR4' ün yerini belirlemek amacıyla farelerde kandidoz oluşturulmuştur. TLR2 ve TLR4 defektli farelerde yapılan deneylerde, sadece TLR2' nin sitokin üretimi artırdığını, TLR4' ün bu etkiyi göstermediği belirlenmiştir. Buna göre, TLR2' nin antikandidal yanıtta primer etkili olduğu bildirilmektedir ⁹⁷.

TLR6, hücre yüzeyinde yer alan ve TLR2 ile birlikte heterodimer yapıda olup mantarların tanınmasında görev alan bir reseptördür. Hücre içi MyD88 yolu aktivasyonuna neden olarak çeşitli sitokin ve kemokinlerin aktiveleşmesini sağlar.

Yapılan bir çalışmaya göre, allojenik kök hücre transplantasyonu yapılan hastalarda invaziv *Aspergillus* enfeksiyonuna duyarlılığın nedenleri araştırıldığında, bu grup hastalarda TLR4 ve TLR6 polimorfizmlerinin olduğu bildirilmiştir ⁹⁸.

TLR yolağının aydınlatılmasında çok sayıda hücre üzerine çalışmalar yapılmıştır. Makrofajların deneysel keratomikoz olgularındaki işlevine ait yapılan çalışmalardan birinde, Hu ve ark., deneysel olarak keratit oluşturulan farelerin kornealarının incelenmesi sonucunda, Th1 hücrelerinden üretilen çeşitli sitokinlerle, TLR4 ifadenmesinin yüksek

olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada, makrofajların lokal olarak *Candida*' ya karşı oluşturulan yanıtta önemli rolü olduğu gösterilmiştir⁹⁹.

TLR' ler immün sistemde patojenin tanınmasında aracı rol üstlenir. TLR aktivasyonu, respiratuvar sistemde astım hastalığına karşı koruyucudur. Bu mekanizmayı aydınlatan çalışmalardan biri de Moreira ve ark. tarafından yapılmıştır. *A. fumigatus* ile enfekte edilen farelerde kronik astım oluşturulmuş, TLR6 defektli grup ile kontrol grubu karşılaştırılarak DH' lerden ifadelenen IL-23 ve IL-17 yanıtları değerlendirilmiştir. Verilere göre, TLR6 aktivasyonunun, *Aspergillus*' u tanıyıp, hücre içine ileten mekanizmaları başlattığı, IL-23 üretimi ve Th17 yanıtı için esansiyel olduğu belirlenmiş ve TLR6 aktivitesinin astım patogenezinde önemli rolü olduğu tespit edilmiştir¹⁰⁰.

Netea ve ark.' nın 2008 yılında yaptıkları çalışmalarında, TLR1 ve TLR6' nın *C. albicans*' ın tanınmasındaki rolünü belirlemek amacıyla dissemine kandidiyazis modeli oluşturulmuştur. Çalışmada, TLR6 ve TLR1 defektli farelerde peritoneal makrofajlardan sitokin salınımı araştırılmıştır. TLR1' in fungal tanımayla ilişkili olmadığı, TLR6' nın özellikle Th1/Th2 dengesi üzerine etki ederek *Candida* enfeksiyonunu yönlendirdiği bildirilmektedir¹⁰¹.

Çalışmamızda, *C.albicans* ve *C. krusei* suşları ile uyarılan DH' lerde, kontrol kuyucuklarına göre TLR6 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artış meydana gelmiştir (p=0.050). Hücreyi enfekte eden maya sayısında artışın daha fazla TLR6 üretimine neden olduğu görülmüştür. Ayrıca, DH' nin *Candida* suşları ile uyarımında süre arttıkça TLR6 uyarımı azalmıştır. Ayrıca, *C. albicans*, *C. krusei*' ye oranla daha fazla TLR6 üretimi sağlamıştır.

Yaptığımız çalışmada, TLR4 ve TLR6' nın *Candida* suşları ile enfekte edilen DH kuyucuklarında, kontrol kuyucuklarına göre arttığı, daha fazla mayayla uyarılan DH' lerin daha fazla oranda reseptör oluşturduğu

belirlenmiştir. Çalışmamızın sonuçları, yukarıda bahsedilen çalışmalarla benzer bulgular taşımaktadır.

Ancak bazı çalışmalarda bizim bulgularımızın tersine sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir.

Hong ve ark. PRR reseptörlerin *Candida*' ya karşı yanıtını açıkladıkları çalışmada, kronik mukokütanöz kandidiyazisli hastaların DH maturasyonu ve reseptör özellikleri incelenmiştir. Olgunlaşmamış DH' lerde TLR2, TLR4 ve TLR6 yanıtının kontrol grubuyla kıyaslandığında değişim göstermediğini, bu hasta grubundaki farklılığın PRR değişiminden değil de DH maturasyon bozukluğundan meydana geldiği bildirilmektedir

102.

Bahri ve ark. genelde insanlarda nadir patojen olabilen *Candida famata* ile oral epitel hücreleri üzerine yaptıkları çalışmada bizim çalışmamıza benzer olarak epitel hücrelerden TLR2, TLR4, TLR6 ifadenmesinin *Candida* stimülasyonu ve zamanla paralel olarak arttığını belirlemişlerdir ¹⁰³.

Çalışmamızın verileri doğrultusunda, anti-kandidal tanımda TLR2, TLR4 ve TLR6' nın etkin rol oynadığı düşünülmektedir. Çalışmamızda ELISA yöntemi ile TLR sekresyonunun 24. saatte, 48. saate oranla daha fazla olduğu görülmektedir. Aynı zamanda, *C. albicans*' in *C. krusei*' ye oranla DH' lerden daha yüksek oranda TLR ifadenmesine neden olduğu görülmüştür. Bu verilere göre, *C. albicans*' in *C. krusei* ile tanınma açısından farklılık olabileceği, daha virülan olduğu ya da komponentlerinin TLR sekresyonu açısından daha fazla uyarıcı özellikte olduğunu söyleyebiliriz.

Kemokinler, inflamatuvar cevap sırasında birçok hücre tarafından üretilmekte, hücreler arası iletişimin yönlendirilmesinde organizmada gerçekleşen birçok biyolojik süreçte önemli rol oynamaktadır. Kemokinler, lökosit-endotelial hücre ilişkilerinde, T ve B hücre matürasyonunda,

immün denetim, tolerans oluşumunda, T-B hücre iletişimde ve primer immün cevabın oluşmasında etkin olmaktadır. Ayrıca, dendritik hücre fonksiyonlarında, T hücre farklılaşması ve fonksiyonlarının sağlanmasında, efektör T hücre cevabı ve inflamatuvar hastalıklarda, mukozal immünitede rol oynamaktadır.

İlk kez 1996 yılında tanımlanan CCR5' in aktivasyonu, hücrelerde cAMP üretiminin inhibisyonu, Ca^{+2} salınımının uyarılması, MAP kinaz aktivasyonu ile sonuçlanır. CCR5, lenfosit, kandaki monosit/makrofaj, DH, primer ve sekonder lenfoid organlardan ifadelenir. Ayrıca, DH maturasyonunda önemlidir. Uyarılması birçok kemokin reseptörünün aktivasyonuna neden olur. CCR5' in Th1 yanıtta yer almasına rağmen, IL-2' den etkilenecek Th2 yanıtında etkili olmaz.

İnvaziv Aspergilloz, özellikle immünsuprese hastalarda sıklıkla görülen enfeksiyonlardan biridir. Etkene yönelik immünitede primer görev yapan hücrelerden biri olan DH ve PMN üzerine yapılan bir çalışmada, kemokinlerle *Aspergillus*' a karşı oluşturulan immünitenin bağlantısı değerlendirilmiştir. Gafa ve ark.' nın çalışmasına göre, fagosit edilen *Aspergillus*' a ait hif ve konidyalar DH' lerden CCR5, CXCR3, CCR6, CCR7, CXCL8 başta olmak üzere geniş çaplı bir kemokin ailesinin aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu kemokinler sayesinde, lenf nodunda henüz olgunlaşmamış DH' lerin maturasyonu, DH- T hücre etkileşiminin başlatılıp sürdürülmesi, küfe yönelik Th1 yanıtının oluşumu ve gelişmesi, nötrofillerde fagositik enzimlerin artması ve sonuç olarak da *Aspergillus*' a karşı doğal ve kazanılmış immünitenin gelişimi sağlanmaktadır¹⁰⁴.

Çalışmamızda, çeşitli oranlarda *C.albicans* ve *C. krusei* suşları ile uyarılmış DH' ler, 24. ve 48. saatlerde kontrol kuyucuklarına göre CCR5 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artışa neden olmuştur ($p=0.0003$). *C. krusei*, *C. albicans*' a oranla daha fazla CCR5 sekresyonu sağlamıştır. Her iki maya için de 24. sa ve 48. saat birbirine yakın seviyelerde CCR5 üretimi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, artan maya

sayısının hücrelerden daha fazla CCR5 üretimine neden olduğu görülmüştür.

CXCR4, üzerinde en çok çalışılan kemokin reseptörlerindendir. “Fusin” olarak da bilinir. Monosit, DH, T ve B hücrelerinin yüzeyindeki varlığının hücrelerin maturasyonu ile arttığı gösterilmiştir. CXCR4’ ün temel görevi, immün hücreler aracılığıyla patojenin hücre içine girişini engellemektir. CXCR4’ ün daha çok Th2 tip yanıt ile ilişkili olduğu düşünülmektedir ^{52,54}.

Kemokinlerin hücreler üzerindeki etkilerini belirlemek üzere Jensen ve ark. çalışmalarında, bir maya olan *S. cerevisiae* özütünden elde edilmiş immünojenleri (EpiCor) kullanmışlardır. Invitro olarak oluşturulan PMN, B ve NK hücre kültürlerinde, immünojenin bu hücrelerin yüzey belirteçlerinde belirgin bir artışa sebep olduğu, IFN- γ salgılanması ile T hücre üretimini hızlandırdığını, aynı zamanda CXCR4 üretimini de artırdığını belirlemişlerdir. Uyarılan kemokin reseptörleri yardımıyla diğer hücrelerin uyarımının artacağını ve inflamasyon bölgesine geliş sürelerinin kısılacağı bildirilmektedir. Bu tür maya bazlı immünojenlerin, özellikle immünsuprese bireylerdeki enfeksiyon etkenlerine karşı immüniteyi hızla harekete geçirerek hastalığın önlenmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir ¹⁰⁵.

Çalışmamızda, farklı miktarlarda *C. albicans* ve *C. krusei* suşları ile enfekte edilmiş DH’ ler, 24. ve 48. saatlerde kontrol kuyucuklarına göre CXCR4 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artışa neden olmuştur ($p < 0.001$). *C. krusei*, *C. albicans*’ a oranla daha fazla CXCR4 artışı sağlamıştır. Her iki maya için de 24. sa ve 48. saatlerde birbirine yakın seviyelerde CXCR4 üretimi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, artan maya sayısının hücrelerden daha fazla CXCR4 üretimine neden olduğu görülmüştür.

CX3CR1, fraktalkin ligandının reseptörüdür. Periferik kan, nötrofil, monosit, T hücre, NK hücresi, beyin, iskelet kasından izole edilmiştir. CX3CR1’ in; DH’ lerin göçü ve maturasyonunun başlaması ve DH’ nin patojene adezyonunda başlatıcı görevi bulunmaktadır. Hücre yüzeyinde

belirdikten sonra, hücrenin yapışmasını kolaylaştırdığı için özellikle DH ve T hücreler arası trafiği düzenlemektedir ^{52,58}.

Saprofit bir mikroorganizma olmasına rağmen son dönemlerde ciddi bir patojen olabilen *C. glabrata*, %30-50 oranında mortaliteye sahiptir. Baltch ve ark. maya enfeksiyonunu tedavi etmekte kullanılan çeşitli dozlardaki amfoterisin B, vorikonazol, ekinokandin ve bu ilaçların kombinasyonlarının sitokin ve kemokin üretimindeki değişimlerini araştırmışlardır. Tek başına ekinokandinin yüksek dozları, vorikonazolün tek başına veya kombinasyonlarının, sitokin/kemokin (özellikle MCP-1, MIP-1 β) düzeylerini doza bağlı olarak artırdığını, bu özelliğin de yeni antifungal ilaç oluşumunda veya mevcut ilaçların hastalara kullanımında dikkat edilmesi gereken bir konu olduğu bildirilmektedir ¹⁰⁶.

Mayaların vücuttaki çeşitli enzimlerle etkileşiminin enfeksiyon ile ilişkisine yönelik yapılan çalışmalardan birinde, *C. albicans* hemoksijenazının *C. albicans'* in büyümesinde esansiyel olmamasına rağmen, diğer mikrobiyal ve memeli hemoksijenazlarından farklı olarak konak hemoglobini indüklediği gösterilmiştir. Farelerde oluşturulan dissemine kandidoz modelinde, bu enzimin mayaya ait güçlü bir virulans faktörü olduğu, çeşitli sitokin ve kemokinleri (IL-17, MIP-1 β , MIP-1 α , RANTES gibi) aktiveleştirerek özellikle böbreklerden mayanın temizlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu mekanizmanın ise, *C. albicans'* in ürettiği karbonmonoksit ve hemoksijenazın konak kemokin ve sitokinleri sayesinde gerçekleştiği bildirilmektedir. Bu verilere göre, *Candida'* ya yönelik ilaçlarda hemoksijenazın hedef alınması gerektiği bildirilmektedir ¹⁰⁷.

Huang ve ark. ise HIV pozitif ve negatif olan hastalardan izole ettikleri PMN kültürü ile ilgili çalışmalarında, hücreleri *C. albicans* ile enfekte edip kemokinlerin bu enfeksiyonlardaki rolünü araştırmışlardır. Her iki grupta da MIP-1 β , MIP-1 α ve RANTES gen ifadenmesi yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar, bu kemokinlerin CXCR4 ile değil CCR5 ile

bağlandığını, HIV pozitifliğinin bu kemokinlerin salınması ile ilişkisinin olmadığını, bu kemokinlerin fungal patojenlere karşı savunmada rol aldığını belirtmektedirler ¹⁰⁸.

Çalışmamızda, *C. albicans* ve *C. krusei* suşları ile uyarılmış DH' ler, 24. ve 48. saatlerde kontrol kuyucuklarına göre CX3CR1 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artışa neden olmamıştır ($p>0.001$). *C. krusei* ve *C. albicans* birbirine benzer oranlarda CX3CR1 sekresyonu sağlamıştır. Her iki maya için de 24. sa ve 48. saatlerde birbirine yakın seviyelerde CX3CR1 üretimi olduğu belirlenmiştir.

Barker ve ark.' nın yaptıkları bir çalışmada, dissemine kandidemi oluşturulan CCR5 defektli fare modelinde endotelin mayaya karşı yanıtı değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, mutant ve vahşi tip *Candida* ile enfekte edilen farelerdeki kemokin (MIP-1 β , MIP-1 α , MIP-2 β , MIP-2 α) sekresyonu araştırılmıştır. Her 2 fare grubunda da MIP-1 β , MIP-1 α ' nın yüksek oranda ifadelenildiği, mutant maya suşunun bu ifadelenmeyi daha da artırdığı belirtilmiştir. Araştırmacılar, CCR5 defektli fareler ile vahşi tip fareler arasında yaşam süresi ve böbrekte mayanın enfeksiyon oluşturma yeteneği açısından bir fark görmediklerini, bu verilere dayanarak da immüno kompetan farelerde, dissemine kandidemiye karşı oluşturulan yanıtta CCR5' in mutlak gerekli olmadığını belirtmektedirler ¹⁰⁹.

İmmün sistem kendi içinde reseptör-molekül ilişkisi içinde haberleşme esasına dayanır. Ghosh ve ark., PMN hücrelerdeki TLR, sitokin ve kemokin profillerinin birbiri ile ilişkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, TLR2 ve TLR4' ün proinflatuvar kemokinlerden MIP-1 β , MCP-1, RANTES' in oluşumunu tetiklerken, zayıf TNF- α ve IL-1 oluşumuna neden olduğu belirlemişlerdir. Çalışmaya göre, TLR agonistlerinin çeşitli sitokin ve kemokin profillerini indüklediği, buna rağmen TCR aracılı cevaba düşük düzeyde etkili ya da etkisiz olduğu bildirilmiştir ¹¹⁰.

Overland ve ark. tarafından yapılan deneylerde, fare ve rat Kupffer hücreleri *A. fumigatus* ve *C. albicans* hif ve konidyalari ile enfekte edilmiş

ve bu dokularda TNF- α , IL-10, MIP-2 profilleri kontrol edilmiştir. TLR4 defektli hücrelerin bu glikoproteinleri üretmediği, buna dayanarak TLR4' ün hücrelerin fungal enfeksiyonlarda sitokin ve kemokin ifadenmesini yönlendirdiği belirlenmiştir ¹¹¹.

Candida' ya savunmada ilk olarak görev alan hücrelerden biri de monosit ve bu hücrelerden köken alan türevleridir. Bu hücrelerin aktive olması, çeşitli sitokin ve kemokin üretimleriyle beraber fagositoz, kemotaksis, mikrobisidal aktivite mekanizmaları harekete geçer. Aynı zamanda, bu hücreler T hücrelere mayayı sunma ve işleme yeteneğine de sahiptir. Kim ve ark.' nın çalışmasına göre, insan monositleri *C. albicans* ile enfekte edilmiş; aktive olan ya da inhibe olan genlerin analizini yapılmıştır. İnkübasyon süresi ilerledikçe, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, IL-8 seviyelerinin çok yüksek oranda arttığı gözlemlenirken, TLR2, TLR4 oranlarında değişiklik olmadığı görülmüştür. Araştırmacılar, *C. albicans* ile enfekte olan hücrelerde gen ifadenmesinin kaskad şeklinde devam ettiğini ve bu aktive ya da inhibe olan genlerin immün hücrelerin korunması ve aktivasyonları ile direk ilişkili olduğunu söylemektedirler ¹¹².

Jouault ve ark.' nın çalışmasına göre, *C. albicans*' in hücre duvar bileşenlerinden fosfolipomannan bağımlı stimülasyonun TLR' e etkisi değerlendirilmiştir. Invivo ve invitro yapılan deneylerde, TLR4 ve TLR6 defektli makrofajların *Candida*' ya sınırlı bir yanıt oluşturabildiği, TLR2 gen delesyonlu grupta ise hücresel yanıtının oluşmadığı görülmüştür. Fosfolipomannanın mayanın TLR' ler aracılı tanınmasında uyarıcı nitelikte olduğu görülmektedir ¹¹³.

Bu çalışmalarda da belirtildiği gibi, enfeksiyonların oluşumu ve gelişimi sırasında birden fazla mekanizma karşılıklı etkileşim halindedir. Daha önce yapılan çalışmaların çoğu, nötrofil ve monositlerin *C. albicans* ile uyarıldığında sitokinleri salgılayıp salgılamadıkları veya hayvan deney modellerinde *C. albicans* enfeksiyonlarında serumda sitokin düzeylerinin araştırılması üzerine yoğunlaşmıştır. Çalışmamızın, *Candida* suşları ile

hücrenin ilk karşılaşması sırasında DH' lerde meydana gelen reseptör-ligand dengesini hem TLR hem kemokin düzeyinde göstermesi ve farklı *Candida* suşlarının, farklı zaman aralıklarında karşılaştırılması açısından önemli ve özgül olduğunu düşündürmektedir.

Kemokinlerin uyarılması, kemotaksis ve fagositozun öncü aşamalarını harekete geçirmektedir ^{58,59}. CCR5 ve CXCR4 düzeyleri enfekte gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluştururken, CX3CR1 anlamlı bulunmamıştır. Bu durum muhtemelen, CX3CR1' in ifadelenmesi kronik enfeksiyonlarla ilişkili olabileceği veya daha yüksek konsantrasyonlarda *Candida* ile ilişkilendirilebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, *C. albicans* ile *C. krusei* suşlarının hem TLR hem kemokin ifadelenmesi ve sekresyonu üzerine etkileri karşılaştırılmıştır. Verilerimize göre, *C. albicans* TLR sekresyonu açısından daha aktif rol oynarken, *C. krusei*' nin kemokin uyarımında daha güçlü bir etken olduğu düşünülmektedir. Bu durum, belki de maya türlerinin hücre duvar yapılarında bulunan moleküllerin küçük çaplı farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda, *Candida* türleri ve DH etkileşiminde süre artışına bağlı olarak DH' lerden TLR ve kemokin ifadelenmesi ve sekresyonlarında değişiklikler olmuştur. TLR' ler süreye bağlı olarak azalma gösterirken, kemokin grubu 24. sa ve 48. sa arasında benzer oranlarda sekrete edilmiştir. Buna göre, TLR' nin ilk uyarımda görev alıp haberci nitelikte olduğu, kemokinlerin daha uzun sürede ifadelenerek hücre içi mekanizmaları tetiklediği düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Candida ve immün sisteminin diğ r elemanları arasındaki ilişkinin çok karmaşık olduğu düşünülmektedir. Çok sayıda bileşen birbiriyle etkileşim halinde görev yapmaktadır. TLR ve kemokinler de bu enfeksiyonda mutlaka etkin rol oynamaktadır. Bu reseptörler enfeksiyon etkeninin ilk tanınması esnasında görev yapmaya başlayarak, diğ r immün sistem elemanlarını da etkileme özelliğindedir. Bu  r nlerin varlığı ya da yokluğu enfeksiyonun başlaması ve sonlandırılması ile ilişkili olabilir. *Candida* enfeksiyonundaki kemokin ve TLR profilinin tam olarak belirlenebilmesi, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda önemli mortalite nedeni olan bu enfeksiyonlardan korunulmasında ve tedavisinde yeni seçeneklerin geliştirilmesinde etkin rol oynayacaktır.

FUNGAL ENFEKSİYONLARDA DENDRİTİK HÜCRELERDEN İFADELENEN TOLL-LIKE VE KEMOKİN RESEPTÖRLERİNİN ROLÜ

7. ÖZET

Bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların her geçen gün artış göstermesi, geniş spektrumlu antibiyotiklerin daha yaygın kullanımı, organ nakillerinin çok daha sık yapılması gibi nedenler bu tür hastalarda *Candida* enfeksiyonlarının gelişiminde artışa neden olmaktadır.

Candida enfeksiyonlarına karşı immün cevapta nötrofil, makrofaj ve DH' ler ile bu hücrelerin aktive ettiği Th1 hücreler rol oynamaktadır. Bu nedenle, mayalara karşı doğal ve kazanılmış immünite birlikte görev alır. Doğal bağışıklık, kandidoza karşı koruyucu mekanizmadır. Nötrofiller ile monosit ve türevlerinin fonksiyonel bozuklukları sistemik kandidoz ile ilişkilidir. Doğal bağışıklığın elemanları, mayanın fagosite edilmesi, öldürülmesi ya da T hücrelere sunumu ile görevlidir. Kazanılmış bağışıklık, doğal savunmadan daha sonra gelişen ikinci ve daha önemli olan koruyucu mekanizmadır. Doğal bağışıklık aşıldığı takdirde kazanılmış bağışıklık vücudu korumak üzere devreye girer. *Candida* enfeksiyonlarından korunmada sorumlu immün mekanizmalar hem hücresel hem de sıvısal cevabı içerir. *Candida*' ya karşı hücresel ve sıvısal bağışıklık gelişir fakat hücresel bağışıklığın rolü daha fazladır.

Bu çalışmada, *Candida* türleri ile uyarılan dendritik hücre kültürlerinde PCR ve ELISA yöntemleriyle Toll-like ve kemokin reseptörlerinin ifadenmesi ve sekresyonu araştırılarak, *Candida* enfeksiyonlarında bu reseptörlerin rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızdaki enfeksiyon modeli, invitro olarak *C. albicans* ve *C. krusei* ile uyarılan dendritik hücre kültürü ile oluşturulmuştur. Ayrıca maya içermeyen ve sadece maya içeren kuyucuklar da kontrol grubu olarak

belirlenmiştir. İnkübasyon sürelerinin ardından hücreler ve üst sıvılardaki TLR ve kemokin düzeyleri incelenmiştir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre, kontrol grupları ile kıyaslandığında *Candida* türleri DH'lerden yüksek oranda TLR2, TLR4, TLR6 ifadelenmesi ve sekresyonuna neden olmaktadır. Kemokin reseptörleri değerlendirildiğinde, enfeksiyonla birlikte CCR5 ve CXCR4 üretimi artarken, CX3CR1 üretiminde değişiklik oluşmadığı görülmüştür. Ayrıca, *C. albicans*, *C. krusei*'ye oranla TLR sekresyonunda daha belirgin artışa neden olurken, *C. krusei* daha etkin kemokin artışına neden olmuştur.

Sonuç olarak, *Candida* enfeksiyonu sırasında ilk olarak antijen sunucu hücrelerden dendritik hücrelerin görev aldığı, maya ile etkileşim sonucunda çeşitli reseptörleri aktive ederek immün sistem cevabını yönlendirdiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Candida*, TLR, kemokin

ROLE OF TOLL-LIKE AND CHEMOKINE RECEPTORS EXPRESSED BY DENDRITIC CELLS IN FUNGAL INFECTIONS

8. SUMMARY

Immunocompromised patients increase with each passing day because of using more wide spectrum antibiotics, making much more frequently the organ transplants causes an increase in the development of *Candida* infections in these patients.

The neutrophils, macrophages, DC and Th1 cells which are activated by these cells play a role in immune response against *Candida* infections. For this reason, innate and adaptive immunity work together against to yeasts. The innate immunity is a protective mechanism to candidiasis. The functional disorders of neutrophils and monocytes derivatives are associated with systemic candidiasis. The parts of innate immunity are responsible for phagocytosis and killing of yeast, or the presentation of T cells. Acquired immunity is, which developed after the natural defense, second and more important protective mechanism. If the innate immunity is exceeded, adaptive immunity is activated in order to protect the body. The immune mechanisms, which are responsible for protecting from *Candida* infections, are included both cellular and humoral response. The cellular and humoral immunity are developed against to *Candida*, but the role of cellular immunity is more.

In this study, we investigated that the expression and secretion of Toll-like and chemokine receptors by PCR and ELISA methods in dendritic cell cultures stimulated with *Candida* species and we aimed that the role of these receptors in *Candida* infections.

Infection model in our study, the invitro *C. albicans* and *C. krusei*-induced dendritic cell culture was established. Also yeast-free and only yeast containing wells were taken as control groups. After the incubation times, the cells and levels of TLR and chemokine levels in supernatants were investigated.

According to the results of our study, when compared with the control group, *Candida* species were caused high TLR2, TLR4, TLR6 expression and secretion from DC' s. In the evaluation of chemokine receptors, while the production of CCR5 and CXCR4 are high with the infection, CX3CR1 were not occur. Also, while *C. albicans* caused a significant increase compared to *C. krusei* in the secretion of TLR, *C. krusei* caused more effective in chemokine increasing.

As a result, during the *Candida* infection, dendritic cells are activated first in antigen-presenting cells, as a result of interaction with various receptors yeast directed by activating the immune system response is concluded.

Key words: *Candida*, TLR, Chemokine

9. KAYNAKÇA

- 1- Edwards J.E. *Candida* Species. In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th edition. New York: Churchill Livingstone; 2010. p. 3225-3240.
- 2- Koneman E. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2006. s.1153-1230.
- 3- Tümbay E. Fırsatçı Mikozlar. içinde: Ahmet Başustaoğlu, editörler. Tıbbi Mikrobiyoloji. 6. Baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2010. s. 751-759.
- 4- Male D. İmmünoloji. 7. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2008. s. 3-277.
- 5- Delves P. Roitt's Temel İmmünoloji. 11. Baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2008. s. 1-278.
- 6- Bauer S., editors. Target pattern recognition in innate immunity. 1th edition. London: Springer; 2009.
- 7- Turul T. Ersoy F. Dostu düşmanı ayıran bir doğal immünite bileşeni: toll-like reseptörler (TLR). Hacettepe Tıp Dergisi 2004; 35: 114-118.

- 8- Romani L. Overview of the fungal pathogens. In: Kauffmann H. E., Sher A., Ahmed R., editors. Immunology of infectious diseases, Washington: ASM Press; 2003, 25-37.
- 9- Dignani M. C., Solomkin J. S., Anaissie E. J. *Candida*. In: Anaissie E. J., editors. Clinical mycology. New York: Churchill Livingstone; 2003. 195-239.
- 10- Vazquez J. A., Sobel J. D. Candidiasis. In: Dismukes W. E., editors. Clinical mycology. Oxford: Oxford University Press; 2003. 143-187.
- 11- Hazen K.C., Howell S.A. Fungi- *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medial importance. In: Murray P.R., Jorgensen J.H., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover K.C., editors. Manual of Clinical Microbiology .8th edition. Washington D.C., American Society for Microbiology Press; 2003: 693-1711.
- 12-Topçu A.W., Çerikçioğlu N. *Candida* türleri. In:Topçu A.W., Söyletir G., Doğanay M. Editörler. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul, Nobel Matbaacılık; 2002: 1797-1808.
- 13- Kalkancı A., Kuştimur S., *Candida albicans* Hücre Duvar Yapıları. İnfeksiyon Dergisi 1999; 13(3): 467-471.
- 14- Tsai P., Chen Y., Hsu P., Lan C. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: a mini review. Biomedicine 2012 (Baskıda).

- 15- Herring A.C., Huffnagle G.B. Innate immunity and fungal infections.
In: Kauffmann H. E., Sher A., Ahmed R., editors. Immunology of infectious diseases. Washington: ASM Press; 2003, 127-137.
- 16- Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013 Feb 15;4(2):119-128.
- 17-Cuéllar-Cruz M, López-Romero E, Villagómez-Castro JC, Ruiz-Baca E. *Candida* species: new insights into biofilm formation. Future Microbiol. 2012 Jun;7(6):755-771.
- 18- Garcia-Vidal C, Viasus D, Carratalà J. Pathogenesis of invasive fungal infections. Curr Opin Infect Dis. 2013 (baskıda).
- 19- Romani L. Immunity to fungal infections. Nat Rev Immunol. 2011;11(4): 275-288.
- 20- Oral B. Toll-like reseptörler. Klimik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi.
- 21- LeibundGut- Landmann S., Withrich M., Hohl T. Immunity to fungi. Current Opinion in Immunology 2012; 24: 449-458.
- 22- Kumagai Y, Akira S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. J Allergy Clin Immunol. 2010; 125(5): 985-992.
- 23- Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. J Mol Med (Berl). 2006; 84(9): 712-725.

- 24- Ebel F., Heesemann J. Toll-like Receptors and Fungal Recognition. The Mycota VI. 2nd edition, Heidelberg: Springer; 2008.
- 25- Sandor F, Buc M. Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands. *Folia Biol (Praha)*. 2005; 51(5): 148-157.
- 26-Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol*. 2004; 42(6): 485-498.
- 27- Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Korting HC. Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends Microbiol*. 2004; 12(1): 44-49.
- 28- Beutler B. Microbial Pathogenesis and the Discovery of Toll-Like Receptor Function. *Vaccine Adjuvants: Immunological and Clinical Principles*. Edited by: C. J. Hackett and D. A. Harn, Jr. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2006.
- 29-Brikos C., O'Neill L. Signalling of Toll-like Receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer; Berlin. 2008.
- 30- Gay N. J., Gangloff M. Structure of Toll-Like Receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer; Berlin. 2008.
- 31- Li X., Jiang S., Tapping R. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine* 49 (2010): 1-9.

- 32-Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. Clin Microbiol Rev. 2009; 22(2): 240-273.
- 33- İnci A., Bişkin Z. Toll-Like Reseptörler ve Protozoon Enfeksiyonlarındaki Roller. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2007; 4(2): 121-128.
- 34- Takeda K., Kaisho T., Akira S. Toll-Like Receptors. Annu. Rev. Immunol. 2003; 21: 335-376.
- 35- Atkinson T. J. Toll-Like Receptors, Transduction-Effector Pathways, and Disease Diversity: Evidence of an Immunobiological Paradigm Explaining All Human Illness? International Reviews of Immunology 2008; 27: 255-281.
- 36- Blanco JL, Garcia ME. Immune response to fungal infections. Vet Immunol Immunopathol. 2008; 125(1-2): 47-70.
- 37- Sabroe I, Parker LC, Dower SK, Whyte MK. The role of TLR activation in inflammation. J Pathol. 2008; 214(2): 126-135.
- 38- van de Veerdonk F., Kullberg B., van der Meer J., Gow N., Netea M. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. Current Opinion in Microbiology 2008; 11: 305-312.

- 39- Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM.
The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front Immunol.* 2012;
3: 79.
- 40- Goodridge H., Underhill D. Host recognition of fungal pathogens.
Drug Discovery Today: Disease Mechanisms 2007; 4(4): 247-251.
- 41- Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA,
Calvano SE, Lowry SF. Human toll-like receptor 4 mutations but not
CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-
negative infections. *J Infect Dis.* 2002; 186(10): 1522-1525.
- 42- Kawasaki K, Nishijima M. Molecular basis for innate immune
recognition of microbial components. *Jpn J Infect Dis.* 2001; 54(6):
220-224.
- 43- Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky
A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-
like receptor 6. *Int Immunol.* 2001; 13(7): 933-940.
- 44- Akira S. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006; 311: 1-
16.
- 45- O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing
adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2007;
7(5): 353-364.
- 46- Güven B., Can M. Çeşitli Hastalıklarda Toll Benzeri Reseptörlerin
Rolü. *Sakarya Medical Journal* 2012; 2(1): 1-10.

- 47- Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(8): 535-542.
- 48- Bourgeis C., Kuchler K. Fungal pathogens- a sweet and sour treat for toll-like receptors. *Cellular and Infection Microbiology* 2012; 2: 1-8.
- 49- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol.* 2007; Chapter 14: Unit 14.12.
- 50- Över U., Söyletir G. Kemokinler ve Kemokin Reseptörleri: HIV Patogenezinde Yeni Umut. *Flora* 1998; 3(3): 192-199.
- 51- Graham G.J., Nibbs R. The Chemokine Receptors. Humana Press, Totowa. 2007.
- 52- David J., Mortari F. Chemokine Reseptors. *Clinical and Applied Immunology Reviews* (2000): 105-125.
- 53- Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity.* 2009; 31(5): 711-721.
- 54- Horuk R. Chemokines. *Scientific World Journal.* 2007; 7: 224-232.
- 55- Busillo JM, Benovic JL. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1768(4): 952-963.

- 56- Fernandez EJ, Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002; 42: 469-499.
- 57- Juan. Colobran R. Chemokines and Chemokine Receptors. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2009.
- 58- Blanchet X, Langer M, Weber C, Koenen RR, von Hundelshausen P. Touch of chemokines. *Front Immunol*. 2012; 3: 175.
- 59- Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125 (2 Suppl 2): S53-72.
- 60-Balkwill FR. The chemokine system and cancer. *J Pathol*. 2012; 226(2): 148-57.
- 61- Mueller A, Strange PG. The chemokine receptor, CCR5. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(1): 35-38.
- 62- Ardavin C, Amigorena S, Reis e Sousa C. Dendritic cells: immunology and cancer immunotherapy. *Immunity* 2004; 20: 17-23.
- 63- Steinman R. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* 2003; 111:675-697.
- 64- Hochrein H, O'Keeffe. Dendritic cell subsets and toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2008; 183: 153-179.

- 65- Lipscomb MF, Wilder JA, Masten BJ. Dendritic cells and their role in linking innate and adaptive immune responses. In: Gessani S, Belardelli Feds. The biology of dendritic cells and HIV infection. Springer 2007: 45-84.
- 66- Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 52-60.
- 67- Münz C, Steinman RM, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med*. 2005; 202(2): 203-207.
- 68- Foti M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell interactions and cytokine production. In: Cytokines as Potential Therapeutic Targets for Inflammatory Skin Diseases. Ernst Schering Res Found Workshop 2006; 56: 61-80.
- 69- Granucci F, Zanoni I. The dendritic cell life cycle. *Cell Cycle*. 2009; 8(23): 3816-3821.
- 70- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18: 767-811.
- 71- Ellepola A. N. B., Morrison J. C. Laboratory Diagnosis Of Invasive Candidiasis. *The Journal Of Microbiology* 2005; 43(S): 65-84.

- 72- Forbes, B. A., Sahm D. F., Weissfeld A. S. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology 12th edition. Elsevier. Philadelphia. 2007.
- 73- McPherson M., Moller S. PCR. 2th edition. New York. Taylor & Francis Group. 2006.
- 74- Arı Ş. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. İçinde: Temizkan G., Arda N., editörler. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 2. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2004. 101-120.
- 75- Hayden R. T. (Dolapçı İ.) İn Vitro Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri. İçinde: Persing D. H., Tenover F. C., Versaloviç J., Tang Y., Unger E. R., Relman D.A., White T. J., editors. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. 1. baskı. Ankara: Palme Yayınevi; 2006. 43-69.
- 76- Köksal F. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri. İçinde: Durmaz R (ed), Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji (2. baskı) Nobel Kitabevi, Malatya 2001;15-34.
- 77- Dignani M., Solomkin J., Anaissie E. Candida In: Clinical Mycology. 2nd edition. London. Elsevier 2009. 197-211.
- 78- Lau A. Chen S., Sorrell T., Carter D., Malik R., Martin P., Halliday C. Development and Clinical Application of a Panfungal PCR Assay To Detect and Identify Fungal DNA in Tissue Specimens. Journal Of Clinical Microbiology 2007; 45(2): 380-385.

- 79- Plaine A, Yáñez A, Murciano C, Gaillardin C, Gil ML, Richard ML, Gozalbo D. Enhanced proinflammatory response to the *Candida albicans* gpi7 null mutant by murine cells. *Microbes Infect.* 2008; 10(4): 382-389.
- 80- van Bruggen R, Drewniak A, Tool AT, Jansen M, van Houdt M, Geissler J, van den Berg TK, Chapel H, Kuijpers TW. Toll-like receptor responses in IRAK-4-deficient neutrophils. *J Innate Immun.* 2010; 2(3): 280-287.
- 81- Pietrella D, Bistoni G, Corbucci C, Perito S, Vecchiarelli A. *Candida albicans* mannoprotein influences the biological function of dendritic cells. *Cell Microbiol.* 2006; 8(4): 602-612.
- 82- Min L., Ze-hu L., Qing C., Wu-quing Z., Mei-wen Y., Gui-xia L., Xue-lian L., Yong-nian S., Insoluble β -glucan from the cell wall of *Candida albicans* induces immune responses of human THP-1 monocytes through Dectin1. *Chin Med J* 2009; 122(5): 496-501.
- 83- van der Graaf CA, Netea MG, Verschueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect Immun* 2005; 73 (11): 7458-7464.
- 84- Villamón E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Fradelizi D, Gil ML. Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes Infect.* 2004; 6(1): 1-7.

- 85- Woehrle T, Du W, Goetz A, Hsu HY, Joos TO, Weiss M, Bauer U, Brueckner UB, Marion Schneider E. Pathogen specific cytokine release reveals an effect of TLR2 Arg753Gln during *Candida* sepsis in humans. *Cytokine*. 2008; 41(3): 322-329.
- 86- Suttmüller RP, den Brok MH, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LW, Kullberg BJ, Joosten LA, Akira S, Netea MG, Adema GJ. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2006; 116(2): 485-494.
- 87- Megías J, Maneu V, Salvador P, Gozalbo D, Gil ML. *Candida albicans* stimulates in vivo differentiation of haematopoietic stem and progenitor cells towards macrophages by a TLR2-dependent signalling. *Cell Microbiol*. 2012.
- 88- Li M, Chen Q, Shen Y, Liu W. *Candida albicans* phospholipomannan triggers inflammatory responses of human keratinocytes through Toll-like receptor 2. *Exp Dermatol*. 2009; 18(7): 603-610.
- 89- Murciano C, Yáñez A, Gil ML, Gozalbo D. Both viable and killed *Candida albicans* cells induce in vitro production of TNF-alpha and IFN-gamma in murine cells through a TLR2-dependent signalling. *Eur Cytokine Netw*. 2007; 18(1): 38-43.
- 90- Pivarcsi A, Bodai L, Réthi B, Kenderessy-Szabó A, Koreck A, Széll M, Beer Z, Bata-Csörgő Z, Magócsi M, Rajnavölgyi E, Dobozy A, Kemény L. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol*. 2003; 15(6): 721-730.

- 91- Bellocchio S, Moretti S, Perruccio K, Fallarino F, Bozza S, Montagnoli C, Mosci P, Lipford GB, Pitzurra L, Romani L. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol.* 2004; 173(12): 7406-7415.
- 92- Yuan X, Wilhelmus KR. Toll-like receptors involved in the pathogenesis of experimental *Candida albicans* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51(4): 2094-2100.
- 93- Saegusa S, Totsuka M, Kaminogawa S, Hosoi T. *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* stimulate cytokine secretion from human neutrophil-like HL-60 cells differentiated with retinoic acid or dimethylsulfoxide. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009; 73(12): 2600-2608.
- 94- Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis.* 2002; 185(10): 1483-1489.
- 95- Nakamura K, Miyazato A, Koguchi Y, Adachi Y, Ohno N, Saijo S, Iwakura Y, Takeda K, Akira S, Fujita J, Ishii K, Kaku M, Kawakami K. Toll-like receptor 2 (TLR2) and dectin-1 contribute to the production of IL-12p40 by bone marrow-derived dendritic cells infected with *Penicillium marneffei*. *Microbes Infect.* 2008; 10(10-11): 1223-1227.
- 96- Netea MG, Gow NA, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda G, Hobson RP, Bertram G, Hughes HB, Jansen T, Jacobs L, Buurman ET, Gijzen K, Williams DL, Torensma R, McKinnon A, MacCallum DM, Odds FC, Van der Meer JW, Brown AJ, Kullberg

BJ. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. J Clin Invest. 2006; 116(6): 1642-1650.

97- Gil ML, Gozalbo D. Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections. Front Biosci. 2009; 14: 570-582.

98- Kesh S, Mensah NY, Peterlongo P, Jaffe D, Hsu K, VAN DEN Brink M, O'reilly R, Pamer E, Satagopan J, Papanicolaou GA. TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. Ann N Y Acad Sci. 2005; 1062: 95-103.

99- Hu J, Wang Y, Xie L. Potential role of macrophages in experimental keratomycosis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009; 50(5): 2087-2094.

100- Moreira AP, Cavassani KA, Ismailoglu UB, Hullinger R, Dunleavy MP, Knight DA, Kunkel SL, Uematsu S, Akira S, Hogaboam CM. The protective role of TLR6 in a mouse model of asthma is mediated by IL-23 and IL-17A. J Clin Invest. 2011; 121(11): 4420-4432.

101- Netea MG, van de Veerdonk F, Verschueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ. Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008; 52(1): 118-123.

102- Hong M, Ryan KR, Arkwright PD, Gennery AR, Costigan C, Dominguez M, Denning DW, McConnell V, Cant AJ, Abinun

M, Spickett GP, Swan DC, Gillespie CS, Young DA, Lilic D. Pattern recognition receptor expression is not impaired in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy. Clin Exp Immunol. 2009; 156(1): 40-51.

- 103- Bahri R, Saidane-Mosbahi D, Rouabhia M. *Candida famata* modulates toll-like receptor, beta-defensin, and proinflammatory cytokine expression by normal human epithelial cells. J Cell Physiol. 2010; 222(1): 209-218.
- 104- Gafa V, Remoli ME, Giacomini E, Gagliardi MC, Lande R, Severa M, Grillot R, Coccia EM. In vitro infection of human dendritic cells by *Aspergillus fumigatus* conidia triggers the secretion of chemokines for neutrophil and Th1 lymphocyte recruitment. Microbes Infect. 2007; 9(8): 971-980.
- 105- Jensen S., Hart A., Schauss A. An antiinflammatory immunogen from yeast culture induces activation and alters chemokine receptor expression on human natural killer cells and B lymphocytes in vitro. Nutrition Research 2007; 27: 327-335.
- 106- Baltch AL, Lawrence DA, Ritz WJ, Andersen NJ, Bopp LH, Michelsen PB, Carlyn CJ, Smith RP. Effects of echinocandins on cytokine/chemokine production by human monocytes activated by infection with *Candida glabrata* or by lipopolysaccharide. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012; 72(3): 226-233.
- 107- Navarathna DH, Roberts DD. *Candida albicans* heme oxygenase and its product CO contribute to pathogenesis of candidemia and

alter systemic chemokine and cytokine expression. Free Radic Biol Med. 2010; 49(10): 1561-1573.

- 108- Huang C, Levitz SM. Stimulation of macrophage inflammatory protein-1alpha, macrophage inflammatory protein-1beta, and RANTES by *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* in peripheral blood mononuclear cells from persons with and without human immunodeficiency virus infection. J Infect Dis. 2000; 181(2): 791-794.
- 109- Barker KS, Park H, Phan QT, Xu L, Homayouni R, Rogers PD, Filler SG. Transcriptome profile of the vascular endothelial cell response to *Candida albicans*. J Infect Dis. 2008; 198(2): 193-202.
- 110- Ghosh TK, Mickelson DJ, Fink J, Solberg JC, Inglefield JR, Hook D, Gupta SK, Gibson S, Alkan SS. Toll-like receptor (TLR) 2-9 agonists-induced cytokines and chemokines: I. Comparison with T cell receptor-induced responses. Cell Immunol. 2006; 243(1): 48-57.
- 111- Overland G, Stuestøl JF, Dahle MK, Myhre AE, Netea MG, Verweij P, Yndestad A, Aukrust P, Kullberg BJ, Warris A, Wang JE, Aasen AO. Cytokine responses to fungal pathogens in Kupffer Cells are Toll-like receptor 4 independent and mediated by tyrosine kinases. Scand J Immunol. 2005; 62(2): 148-154.
- 112- Kim HS, Choi EH, Khan J, Roilides E, Francesconi A, Kasai M, Sein T, Schaufele RL, Sakurai K, Son CG, Greer BT, Chanock S, Lyman CA, Walsh TJ.
Expression of genes encoding innate host defense molecules in

normal human monocytes in response to *Candida albicans*. Infect Immun. 2005; 73(6): 3714-3724.

- 113- Jouault T, Ibata-Ombetta S, Takeuchi O, Trinel PA, Sacchetti P, Lefebvre P, Akira S, Poulain D. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. J Infect Dis. 2003; 188(1): 165-172.

10. ÖZGEÇMİŞ

EMİNE YEŞİLYURT

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi ve Yeri : 23.07.1982 Almanya
Medeni Durum : Bekar
Ehliyet : B
Cep Tel : 0 536 872 31 27
E-posta : emineyesilyurt2001@yahoo.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Doktora	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümü (91/100)	2007-2013
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümü (93.0/100)	2005-2007
Lisans	Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (87.0/100)	2000-2004

BURSLAR

- FEMS Research Fellowship 2012 (Ocak - Haziran 2012 Dept. of Clinical Infection, Microbiology and Immunology, Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool)

ÖDÜLLER

-Yeşilyurt E., Kalkancı A., Usta S., Fidan I., Kuştimur S. Pulmoner Aspergilloz Sıçan Modelinde IL-17 Sitokin İfadelenmesinin İncelenmesi.

14. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Mart 2009, Antalya.

- Usta S., Fidan I., Kalkancı A., Yeşilyurt E. Kandidozlu Sıçan Böbrek Dokularında IL-17 Gen İfadelenmesinin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Gösterilmesi. 6.Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi 15-19 Haziran 2010 Ankara. (Birincilik Ödülü)

YABANCI DİL

- İngilizce

YAYINLAR

MAKALELER

Ulusal

- Fidan I., Yeşilyurt E., Yolbakan S., Erdal B. Üriner Sistem Epitel Hücrelerinin Bakterisidal Aktivitesi, Sitokin Ve Kemokin Yanıtı. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 2006: 36 (4) ; 179-183.

- Fidan I., Dizbay M., Erdal B., Yeşilyurt E., Çetin F. Bakteriyel Sepsisin Nötrofil Fonksiyonları Üzerine Etkisi. Ankem Dergisi 2007; 21: 76-80.

- Fidan I., Yeşilyurt E., Erdal B., Gürel F., Yolbakan S., İmir T. On Yaş ve Üzeri Kişilerde Kabakulak, Kızamık, Varisella Seroprevalansı. Klinik Laboratuar Araştırma Dergisi. 2007.

- E. Yeşilyurt, M. Dizbay, S. Usta, I. Fidan. Infeksiyöz Mononükleozlu Hastalarda Serum Sitokin Düzeyleri. Turkish Journal of Infection 2009; 23 (4): 169-172.
- E. Yeşilyurt, I. Fidan. Dendritik Hücreler ve Enfeksiyonlardaki Rolü. TMC Dergisi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 41(3):91-102, 2011

Uluslararası

- Fidan I., Yesilyurt E., Erdal B., Yolbakan S., İmir T. Expression Of Cell Surface Markers On *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* Stimulated Lymphocytes. Indian J Med Res. 2008 Jul; 128(1): 71-8.
- Fidan I, Yeşilyurt E., Çetin Gürelık F, Erdal B, İmir T. Effects of recombinant interferon- γ on cytokine secretion from monocyte-derived macrophages infected with *Salmonella typhi*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2008 Nov; 31(6): 467-75.
- Fidan I., Kalkanci A., Bolat S., Yesilyurt E., Erdal B., Yolbakan S., Kuştımur S., İmir T. Expression of the surface antigens of lymphocytes and the levels of cytokines in mice infected with c. J. Infect Developing Countries 2008; 2(1): 34-39.
- Fidan I, Ozkan S, Gurbuz I, Yesilyurt E., Erdal B, Yolbakan S, İmir T. The efficiency of *Viscum album* ssp. *album* and *Hypericum perforatum* on human immune cells in vitro. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2008; 30(3): 519-28.
- Fidan I, Kalkanci A, Yesilyurt E, Yalcin B, Erdal B, Kustimur S, İmir T. Effects of *Saccharomyces boulardii* on cytokine secretion from intraepithelial lymphocytes infected by *Escherichia coli* and *Candida albicans*. Mycoses. 2009 Jan; 52(1): 29-34.
- Rota S., Fidan I., Muderris T., Yesilyurt E., Lale Z. Cytokine levels in Epstein-Barr virus associated laryngeal carcinoma. The Journal of Laryngology & Otology 2010 Sep;124(9): 990-994.

- Fidan I., Kalkancı A., Yeşilyurt E., Erdal B., Kuştimur S., İmir T. The Effect of Microorganisms on Cytokine Secretion from Bone Marrow Dendritic Cells. Turkish Journal of Medical Sciences.
- Hızal K, Yenicesu I, Erdal B, Yeşilyurt E, Fidan I, Kalkancı A, Dilsiz G. Investigation of West Nile virus seroprevalence in healthy blood donors. Mikrobiyol Bul. 2010 Jul;44(3):425-430.
- Doğruman-Al F., Fidan I., Çelebi B., Yeşilyurt E., Erdal B., Babur C., Kuştimur S. Cytokine profile in murine toxoplasmosis. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2011, 4(1);16-19.

İLGİ ALANLARI

İmmunoloji, Moleküler Mikrobiyoloji, Mikoloji