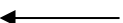
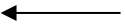


MERVE BALIRAK

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2018



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**ZEOLİTİN ANTİFUNGAL ETKİNLİĞİNİN DİĞER
ANTİFUNGAL İLAÇLARA GÖRE KARŞILAŞTIRILMALI
OLARAK İNCELENMESİ**

MERVE BALIRAK

**DANIŞMAN
PROF. DR. MERAL ÜNÜR**

**AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
AĞIZ, DİŞ, ÇENE HASTALIKLARI PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız , Diş, Çene hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı, Ağız, Diş ve Çene hastalıkları Programında Doktora öğrencisi Merve Balırac tarafından Prof. Dr. Meral Ünür 'ün danışmanlığında hazırlanan "Zeolit'in antifungal etkinliğinin diğer antifungal ilaçlara göre karşılaştırılması olarak incelenmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 16 /01/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

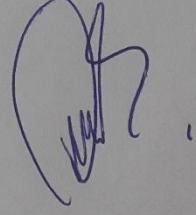
Prof. Dr. Gülsüm AK

İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi,
Ağız, Diş, Çene Cerrahisi Anabilim Dalı**Jüri-Danışman**Prof. Dr. Meral Ünür
İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız, Diş, Çene Cerrahisi
Anabilim Dalı**Jüri**Prof. Dr. Zayre Erturan
İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**Jüri**Doç. Dr. Hasan Garip
Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız, Diş, Çene Cerrahisi
Anabilim Dalı**Jüri**Doç Dr. Ediz Deniz
Yeditepe Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız, Diş, Çene Cerrahisi
Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Merve Balırak (İmza)



İTHAF

Doktora tezimi çok değerli aileme ve eşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım, aynı zamanda hayat tecrübesi konusunda da desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen, danışmanım ve çok değerli hocam, sayın *Prof. Dr. Meral Ünür'e*,

Tezimin mikrobiyoloji deneylerinin yapılmasında çok büyük emeği olan İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalı öğretim üyesi, ikinci tez danışmanım ve hocam, sayın *Doç. Dr. Dilek Şatana'ya*,

Doktora tezimin laboratuvar aşamasında büyük emeği geçen, bilgi ve deneyimlerini paylaştan, yardımlarını esirgemeyen araştırma görevlisi sayın *Dr. Gonca Erköse Genç'e*,

Deneylerimin ana maddesi olan zeoliti temin eden, bilgi ve birikimiyle tez süresince desteğini esirgemeyen sayın *Dr. Sevgi Özyeğin'e*,

Doktora eğitimimi sürdürdüğüm ve uzun yıllarımı geçirdiğim İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş, Çene Cerrahisi ABD, Ağız, Diş, Çene Hastalıkları Kliniği'nin *değerli öğretim üyeleri, uzman ve asistan hekimleri ile tüm çalışanlarına*,

Doktora eğitimim süresince yanımda olan sevgili *Dent pozitif ailesine*,

Hayatımın her anında olduğu gibi doktora eğitimim boyunca da koşulsuz sevgilerini benden esirgemeyen sevgili *geniş aileme*,

Bu süreçte her an yanımda olan en büyük şansım canım *eşime*,

Teşekkür eder, sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 23134

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Ağız mikrobiyolojisi ve mantarlar	3
2.1.1. Ağız mikrobiyolojisi	3
2.1.2. Mantarlar.....	3
2.1.2.1.Candida Türleri.....	5
Oral Candidiazis.....	6
2.1.2.2. Protez stomatiti.....	14
2.1.2.3. Antifungal ilaçlar.....	17
Antifungaller.....	18
A. Sistemik antifungaller.....	19
I) Amfoterisin B.....	19
II) Flusitozin.....	20
III)Griseofulvin.....	20
IV)Azoller	20
B. Topikal Antifungaller	21
I) Nistatin.....	21
Oral kandidiyazis için tedavi seçenekleri	22
2.1.2.4. Antifungal Duyarlılık testleri	23
Antifungal Duyarlılık Testleri ve Klinik Önemi.....	23
a. Difüzyon testi	26
Disk difüzyon testi	26
E test	27

b. Dilüsyon testi	28
Tüp Dilüsyon.....	28
Agar Dilüsyon.....	29
2.1.2.5. İlaç Direnci.....	30
2.2. ZEOLİT.....	32
2.2.1. Zeolit oluşumu	35
2.2.2. Zeolitlerin özellikleri	35
2.2.2.1 Zeolitlerin iyon değiştirici özellikleri ve uygulama alanları.....	37
2.2.3.1. Zeolitin yapısında yer alan katyonların önemi.....	39
2.2.3.2.Zeolitlerde $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ oranının önemi.....	40
2.2.3.3. Gümüş Zeolit.....	41
2.2.4. Zeolitin Kullanım Alanları.....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Kullanılan besiyerlerinin, zeolitin ve resazurinin hazırlanması	46
3.1.1. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) besiyeri hazırlanışı	46
3.1.2. RPMI 1640 Besiyeri hazırlanışı.....	47
3.1.3. Antifungal maddelerin hazırlanışı.....	48
3.1.4. Zeolit süspansiyonunun hazırlanması	49
3.1.5. Resazurin (alamar blue, alamar mavisi).....	51
3.2. Antifungal Duyarlılık Deneyi	52
4. BULGULAR.....	62
5. TARTIŞMA	72
6. KAYNAKÇA.....	80
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	93
ÖZGEÇMİŞ	94

TABLOLAR LİSTESİ

TABLO 2-1: ORAL KANDİDİYAZİSİN SINIFLANDIRILMASI (TARÇIN, 2011).....	8
TABLO 2-2: ANTIFUNGALLERİN KULLANIM ŞEKİLLERİNE GÖRE SINIFLANDIRILMASI;	19
TABLO 2-3: <i>ORAL KANDİDİYAZİSİN TEDAVİ SEÇENEKLERİ</i> (DURAL, 2002).....	22
TABLO 2-4: CLSI M27-S4'E GÖRE AZOLLERİN 24 SAATLİK İNKÜBASYON SONRASINDA MİK (µG/ML) DEĞERLERİ (CLSI M27-S4, 2012)	25
TABLO 2-5: ZEOLİT TÜRLERİ.....	37
TABLO 3-1: PROTEZ STOMATİTLİ HASTALARDAN İZOLE EDİLEN SUŞLARIN DAĞILIMI.	45
TABLO 4-1: 114 SUŞA AIT MİK DEĞERLERİ TABLOSU.....	63

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİL 2-1: ORAL KANDİDİYAZIS (PROF. DR. MERAL ÜNÜR ‘ÜN ARŞIVINDEN)	7
ŞEKİL 2-2: PAMUKÇUK (PROF. DR. MERAL ÜNÜR ‘ÜN ARŞIVINDEN)	9
ŞEKİL 2-3: AKUT ATROFİK KANDİDİYAZIS (PROF. DR. MERAL ÜNÜR ‘ÜN ARŞIVINDEN)	10
ŞEKİL 2-4: KRONİK HİPERPLASTİK KANDİDİYAZIS (PROF. DR. MERAL ÜNÜR ‘ÜN ARŞIVINDEN)	11
ŞEKİL 2-5: MEDIAN RHOMBOID GLOSSİT (PROF. DR. MERAL ÜNÜR ‘ÜN ARŞIVINDEN)	12
ŞEKİL 2-6: ANGULAR ŞELİTİS (PROF. DR. MERAL ÜNÜR ‘ÜN ARŞIVINDEN)	13
ŞEKİL 2-7: PROTEZ STOMATİTİ (PROF. DR. MERAL ÜNÜR ‘ÜN ARŞIVINDEN).....	17
ŞEKİL 2-8: E TEST ŞERİTLERİNİN GÖRÜNÜMÜ	27
ŞEKİL 2-9: 96 KUYUCUKLU ‘U’ TABANLI MİKROPLAK	29
ŞEKİL 2-10: ZEOLİTİN YAPISI.....	33
ŞEKİL 2-11: ZEOLİTİN KAFESE BENZEYEN GÖRÜNÜMÜ.....	33
ŞEKİL 2-12: 25 µM BOYUTLARINDA DOĞAL ZEOLİTE AIT GÖRÜMÜM	34
ŞEKİL 2-13: ZEOLİT A) SOLİD YAPI B) İSKELETSEL YAPI	39
ŞEKİL 2-14: ZEOLİT İÇİNDEKİ ANYON VE KATYONLARIN ŞEMATİK GÖRÜNÜMÜ.	41
ŞEKİL 2-15: ZEOLİTİN KANALCIKLI YAPISINA GÜMÜŞ İYONLARININ YERLEŞMESİ	42
ŞEKİL 3-1 : SABOURAUD DEKSTROZ AGAR (SDA) BESİYERİ	46
ŞEKİL 3-2: RPMİ 1640 BESİYERİ	47
ŞEKİL 3-3: FARKLI SICAKLIK DERECELERİNDEKİ DOĞAL ZEOLİTİN OTOKLAV İŞLEMİ SONRASI GÖRÜNÜMÜ	50
ŞEKİL 3-4: HAZIRLANAN ZEOLİT SÜSPANSİYONU	50
ŞEKİL 3-5: HAZIRLANAN SÜSPANSİYONUN BEKLETİLMESİ SONRASINDA ZEOLİTİN DİBE ÇÖKMESİ	51
ŞEKİL 3-11: RPMİ 1640 BESİYERİNDE DİLÜE EDİLMİŞ <i>CANDIDA</i> SUŞLARI (1/50 VE DAHA SONRA 1/20)	55
ŞEKİL 3-12: RPMİ 1640 BESİYERİNDE DİLÜE EDİLMİŞ <i>CANDIDA</i> SUŞLARININ MİKROPLAKLARA AKTARILMASI.....	56
ŞEKİL 3-13: ZEOLİT SÜSPANSİYONUNUN MİKROPLAĞA AKTARILMASI.....	57
ŞEKİL 3-14: ZEOLİTİN 3 FARKLI FORMUNUN MİKROPLAKTA SERİ DİLÜSYON İŞLEMİ.....	58

ŞEKİL 3-15: ZEOLİTİN SERİ DİLÜSYONU SONRASI MİKROPLAĞIN ALTTAN GÖRÜNÜMÜ	59
ŞEKİL 3-16: <i>C. KRUSEI</i> ATCC6258 İÇİN RESAZURİN İLAVE EDİLMİŞ MİKROPLAK GÖRÜNTÜSÜ	60
ŞEKİL 3-17: SDA BESİYERİNE EKİM GERÇEKLEŞTİRİLMESİ.....	60
ŞEKİL 3-18: <i>C. ALBICANS</i> 'IN, ZEOLİTİN FARKLI SICAKLIK DERECELERİNDEKİ FORMLARININ 200.000 µG/ML'LİK KONSANTRASYONDA SDA'DAKİ ÜREME GÖRÜNÜMÜ (1/1000 SULANDIRIM).....	61
ŞEKİL 4-1: <i>C. ALBICANS</i> 'IN, ZEOLİTİN FARKLI SICAKLIK DERECELERİNDEKİ FORMLARININ 200.000 µG/ML'LİK KONSANTRASYONDA SDA'DAKİ ÜREME GÖRÜNÜMÜ (1/1000 SULANDIRIM).....	69
ŞEKİL 4-2 : <i>C. KRUSEI</i> 'NİN, ZEOLİTİN FARKLI SICAKLIK DERECELERİNDEKİ FORMLARININ 200.000 µG/ML'LİK KONSANTRASYONDA SDA'DAKİ ÜREME GÖRÜNÜMÜ (1/1000 SULANDIRIM).....	70
ŞEKİL 4-3: <i>C. GLABRATA</i> 'NİN, ZEOLİTİN FARKLI SICAKLIK DERECELERİNDEKİ FORMLARININ 200.000 µG/ML'LİK KONSANTRASYONDA SDA'DAKİ ÜREME GÖRÜNÜMÜ (1/1000 SULANDIRIM).....	71

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

CFU	: Koloni Oluşturan Birim (Colony Forming Unit)
CLSI	: Clinical and Laboratory Standard Institute
ESCMID	:The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EUCAST	: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü (Human Immunodeficiency Virus)
MİK	: Minimal Inhibitor Konsantrasyonu
MOPS	: (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid)
NCCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standards
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
SDA	: Sabouraud-dekstroz-agar
spp	: Species
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ÖZET

Balırak M. (2018). Zeolitin antifungal etkinliğinin diğer antifungal ilaçlara göre karşılaştırılması olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş, Çene Cerrahisi AD, Doktora Tezi, İstanbul.

Son yıllarda çeşitli nedenlerle kullanılan ilaçların artışına bağlı olarak fırsatçı enfeksiyonların görülme ihtimali de artmıştır. Antifungal duyarlılık testleri yapılmadan ilaç kullanım sıklığının artışı, bu ilaçlara karşı direnç gelişmesine neden olmuştur ve bu durum alternatif madde arayışını gündeme getirmiştir. Zeolitin antifungal etkinliğinin varlığının araştırılması amacıyla çalışmamızda; protez stomatitli bireylerden elde edilen *Candida* suşlarının, oral kandidiazis tedavisinde sıklıkla kullanılan flukonazol ve itrakonazole karşı antifungal duyarlılığının belirlenmesi ayrıca; zeolitin yüksek sıcaklık ile suyunun uçurularak birim hacimde etken madde miktarının artışı hedeflenmiş, bu artış ile paralel olarak antifungal etkinliğinin de artış göstereceği hipotezi öngörülmüştür.

Bu amaç ile 25 µm boyutlarındaki doğal zeolit minerali 3 saat süreyle 100°C, 200°C ve 400°C olmak üzere üç farklı ısı işleme tabi tutulmuş ve böylece üç farklı tip zeolit elde edilmiştir. Zeolitin 3 farklı formdaki tozlarının RPMI 1640 besiyerinde aseptik koşullarda 200000µg/ml-98µg/ml'lik son konsantrasyon aralığı kullanılarak antifungal aktivitesi araştırılmıştır. Herhangi bir antifungal aktivitenin gözlenmemesi nedeniyle, zeolitin antifungal etkinliğinin bulunmadığını doğrulamak amacıyla tüm kuyucuklardan pipetle 1'er µl'lik hacim alınarak 1/1000 oranında %0.85'lik tuzlu su ile seyreltilmiş, SDA besiyerlerine ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda meydana gelen üremeler değerlendirilmiştir. Yapılan laboratuvar çalışmaları sonucunda, gümüş katkısı olmadan zeolitin herhangi bir antifungal aktivitesinin olmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte zeolitin yüksek iyon alışveriş kapasitesi ve boşluk sistemlerinin olması, bu boşluklara sığabilecek büyüklükte olan gaz ve sıvı molekülleriyle doldurulabilir olması gibi özellikleri nedeniyle iyi bir taşıyıcı molekül olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Zeolit, antifungal direnç, *Candida albicans*, protez stomatiti, mikrodilüsyon.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 23134

ABSTRACT

Balırak M. Comparison of zeolite antifungal efficacy compared to other antifungal drugs. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, PhD Thesis, İstanbul.2018

In recent years, it has been observed that increase in drug use for several reasons has also increased the opportunistic infections. Increased frequency of drug use without antifungal susceptibility testing led developing resistance to these drugs and this situation has brought the search for alternative substances forward. In our study to investigate the presence of zeolite antifungal activity; determination of antifungal susceptibility of *Candida* strains obtained from prosthetic stomatitis patients against fluconazole and itraconazole which are frequently used in oral candidiasis treatment furthermore; it is aimed to increase the amount of active substance per unit volume by blowing water with high temperature of zeolite, the hypothesis that antifungal activity will also increase in parallel with this increase is predicted. For this purpose, natural zeolite minerals with a size of 25 μm were subjected to three different heat treatments for 3 hours at 100°C, 200°C and 400°C, therefore three different types of zeolites were obtained. Antifungal activity of zeolites that was in 3 different types in a powder form were investigated in aseptic conditions in RPMI 1640 medium using the final concentration range of 200000 μg / ml-98 μg / ml. In order to confirm the absence of zeolite antifungal activity due to the absence of any antifungal activity, were diluted with 0.85% saline in 1/1000 volume by taking a 1 μl aliquot from all wells by pipetting and seeded on SDA medium. At the end of the incubation period, reproduction that occurred during this period was assessed. As a result of the conducted laboratory studies, it was determined that without silver addition no antifungal activity of the zeolite was found. However, it is thought that zeolite can be used as a good carrier molecule because of its high ion exchange capacity and its ability to be filled with gaseous and liquid molecules which are large enough to fit in these gaps.

Key Words: Zeolite, antifungal resistance, *Candida albicans*, denture related stomatitis, microdilution.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No:23134

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda immunsupresif tedavi gören hasta sayısının artması, antibiyotik kullanımının artışı, cerrahi girişimlerin artışı, yoğun bakımda yatan hastaların genel durumlarındaki kötüye gidiş gibi nedenler, tanı ve tedavilerde gözle görülen yükselişle birlikte, kullanılan ilaçların yan etkisi olarak fırsatçı enfeksiyonların görülme ihtimalini de arttırmıştır.

Mantarlar en sık fırsatçı enfeksiyonlara neden olan, bazen ölümcül sonuçlara neden olabilen patojenlerdir. Kandidemi; bir veya daha fazla kan kültüründen *Candida* cinsi mayaların izole edilmesi ile saptanır. Kan kültürlerinde etken olan mayalar arasında ilk sırada *Candida albicans*, sonrasında ise albicans dışı *Candida* 'lar yer alır. *Candida* enfeksiyonları, tanısı ve tedavisi zor, diğer patojenlerle ortaya çıkmış sepsisemi olgularına göre daha yüksek mortaliteye sahip ciddi bir klinik tablodur. *Candida* enfeksiyonlarında mortalite oranı %37.9-54 olarak bildirilmiştir. *Candida glabrata* ve *Candida tropicalis* 'in etken olduğu olgularda, mortalitenin daha yüksek olduğu, *Candida parapsilosis* 'in etken olduğu kandidemilerde ise daha düşük olduğu bildirilmiştir (Öztürk ve ark., 2013).

Son yıllarda ampirik antifungal kullanımının yaygınlaşması, fırsatçı fungal patojenlerin sık kullanılan antifungal ilaçlara karşı duyarlılık paternlerinin değişmesine ve hatta buna paralel olarak, beraberinde direnç oranlarında da belirgin artışa yol açtığı bilinmektedir. Bu nedenle, uygun ve etkin antifungal tedavinin belirlenmesinde ve prognoz tahmininde, tür düzeyinde identifikasyon ve antifungal duyarlılık testlerini uygulamak büyük önem kazanmaktadır (Gültekin ve ark., 2011; Etiz ve ark., 2015).

İmmun sistemi baskılanan hastalarda fırsatçı patojen olarak mantar enfeksiyonları oldukça ön plandadır. Yine dental protez kullanan hastalarda da hijyen eksikliği ile beraber oral bölgede fırsatçı patojen olarak *Candida* 'lardan söz etmek mümkündür. Oral bölgede gözlenen mantar enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan antifungal ilaçlar flukonazol, itrakonazol, amfoterisin B ve nistatindir. Ancak bu ilaçların uzun dönemli kullanımlarına bağlı olarak ilaçlara karşı direnç gelişimi söz konusudur. İlaç direncinin meydana gelmesiyle alternatif ilaç ya da madde arayışı gündeme gelmiştir. Bu alanda zeolit akla gelen ilk maddelerden birisidir.

Zeolit kalsiyum, sodyum, magnezyum, aluminyum ve kuartz içerikli suda çözünmeyen bir mineraldir. Boşluklu yapıya sahip olan zeolitin diğer poröz minerallerden farkı boşlukların şekli ve boyutudur. Bu boşluklar sayesinde sıvı ve gaz tutabilen zeolit bu özelliği ile elek görevi görmektedir (Yücel, 1987). Son yıllarda birçok alanda kullanıma giren zeolit tıp ve diş hekimliği alanında da yerini almıştır. Diş hekimliği alanında kanama durdurucu olarak, endodonti de kanal patlılarıyla beraber antimikrobik olarak, protez kaide maddelerinde ve yumuşak doku astar maddelerinde antimikotik olarak kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır (Matsuura ve ark., 1997; Nikawa ve ark., 1997; Ueshige ve ark., 1999; Abe ve ark., 2004).

Zeolitin antibakteriyel etkinliği ile birlikte antifungal etkinliğinin de olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Matsuura ve ark., 1997; Nikawa ve ark., 1997; Ueshige ve ark., 1999; Abe ve ark., 2004). Zeolitin antifungal etkinliğinin varlığının araştırılması, eğer var ise etkinliğinin mevcut antifungal maddeler ile karşılaştırmalı olarak incelenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda; protez stomatitli bireylerden elde edilen *Candida* suşlarının, oral kandidiazis tedavisinde sıklıkla kullanılan flukonazol ve itrakonazole karşı antifungal duyarlılığının belirlenmesi ve zeolitin birim hacimde etken madde miktarı artışının hedeflendiği farklı sıcaklık derecelerinde (100, 200 ve 400 °C) hazırlanmış olan formlarının aynı suşlara karşı antifungal etkinliğinin mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmadaki beklentimiz 100, 200 ve 400 °C'lik farklı sıcaklık derecelerinde elde edilmiş zeolitin antifungal etkinliğinin de sıcaklık artışına paralel doğrultta artış göstereceğidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Ağız mikrobiyolojisi ve mantarlar

2.1.1. Ağız mikrobiyolojisi

İnsan ağızı, vücudun en karmaşık ekosistemlerinden birine sahiptir. Ağız boşluğu; bol besin maddesi ve uygun nem ile ısıya sahip olması sebebiyle mikroorganizmaların üremesi için ideal bir ortamdır. Kişilerin diyetlerini değiştirmeleri, immunolojik ve fizyolojik durumları, çeşitli mikroorganizmalara ağız yoluyla maruz kalmaları, konağın yaşamı boyunca oral flora ekolojisinin dinamik yapısını meydana getirir. Konak ve flora arasında varolan dengenin bozulmaması için oral mukoza ile tükürük salgısı bariyer olarak görev yapar (Mısırlıgil, 2004).

Ağız florası çok sayıda bakteri, mantar, virüs ve protozoon türünü içerir. Ağız içinde sürekli olarak bulunan her protetik yabancı madde uygun olarak temizlenmediğinde oral florada değişikliğe sebep olur. Yapılan bir çalışmada, protez kullanmaya yeni başlayan hastaların oral florasında bulunan *Candida* cinsi mantarlar, *Pneumococcus*, *Neisseria*, *Staphylococcus epidermidis*, *Koliform basil*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Streptococcus* oranlarında uygulama sonrası artışlar olduğu gözlenmiştir (Mısırlıgil, 1981).

Yılmaz ve arkadaşları, metal ve akrilik kaideli protezlerin aerop bakteriler yönünden etkinliklerini kıyaslandıkları çalışmalarında; akrilik kaideli protez kullananların, metal kaideli protez kullananlara göre *Candida* türü mantarlar, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Neisseria* ve *Corynebacterium* cinsi mikroorganizmalarda protez kullanım uygulaması sonrası aerop bakterilerde daha fazla artış meydana geldiğini belirlemiştir (Yılmaz ve ark.,1981).

2.1.2. Mantarlar

Ökaryot hücre özelliğinde olan mantar hücresinin iç kısımda nukleus ve organelleri içeren sitoplazma ile sitoplazma zarı, dış kısımda ise hücre duvarı ile bazı türlerde kapsül bulunur. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde hücre duvarının dış yüzeyinde

fibriller yapılar görülür. Bu fibriller yapılar diğer ökaryotik hücrelere ve plastik yüzeylere tutunmayı sağlamaktadır (Tuckfield ve ark., 1943; Kuştimur, 2004; Murray ve ark., 2007).

Mantarlar morfolojik durumlarına göre mikroform ve makroform yapılar içerir. Morfolojik yapılarına göre küf ve maya olmak üzere iki grupta incelenirler. Bazı mantarlar ise doğal ortamlarda küf, insan vücut sıcaklığında maya şeklinde bulunabilir. Isıya bağlı olarak morfolojik yapı değişikliği gösteren bu türlere dimorfik mantarlar denir (Mısırlıgil, 2004). Flamentöz mantarlar 2-10 µm çapında, uzun dallanan, ipliksi, hif adı verilen yapılar içermektedir. Patojenik etkiden sorumlu bu yapılar bir araya gelerek miçel yapısını oluşturmaktadır. Miçelin besiyerindeki görüntüsüne koloni denilmektedir. Dimorfik mantarlarda hem maya hem de flamentöz biçiminde gelişme gösterebilmesinde besin, ısı, karbondioksit basıncı, oksidasyon-redüksiyon potansiyeli gibi çeşitli çevresel faktörler rol oynamaktadır. Maya mantarları tek hücreli ve tek çekirdekli olup eşeyli ya da eşeysiz olarak üreyebilmektedir. Eşeyli ürediklerinde spor oluştururken, eşeysiz çoğaldıklarında tomurcuklanma ile yalancı hif oluşturmaktadır. Maya hücresi genellikle bakteri hücresinden büyük, yuvarlak, oval veya uzamış şekillerde görülür. Kolonileri genellikle krem-beyaz renkte, opak, mukoid, bazı türlerde pembe-siyah pigmentli ve 0.5-3mm büyüklüğünde olup bakteri kolonilerine benzer görünüme sahiptir (Kuştimur, 2004).

Mantarlar heterojen mikroorganizmalardır. In vivo- in vitro üreme hızını etkileyen faktörler; oksijen, pH, sıcaklık, besiyeri bileşimi gibi faktörlerdir. Mayalar besiyerinde 24 saatte gözle görünür koloni oluşturacak şekilde hızlı üremektedirler. Üremeleri için organik bir azot (N) ve karbon (C) kaynağına ihtiyaçları vardır. Çoğu mantar glikozu kolaylıkla parçalayabilir. Bu nedenle mantarların üretilmesinde kullanılan besiyerlerinde her zaman glikoz olmalıdır. Mantarlar aerob mikroorganizmalar olmaları nedeniyle klinik örneklerin taşınması ve kültürü, aerob koşullarda yapılmalıdır. Çoğu mantarın optimal üreme pH'ı 6.8-7.0 ve optimal üreme sıcaklığı 25-35°C'dir. Laboratuvarlarda mantarlar için zenginleştirilmiş (beyin-kalp infüzyon agarı, malt ekstreli besiyeri), seçici (Sabouraud besiyeri) ve ayırıcı (üre agarı) besiyerleri kullanılmaktadır (Dixon ve Fromtling, 1995).

2.1.2.1. *Candida* Türleri

Candida türleri bölünme ya da tomurcuklanma ile çoğalan, ökaryotik, tek hücreli, kemoheterotrof organizmalardır. Tomurcuklanarak birbirinden ayrılmadan uzar ve aralarında boğumlar meydana getirerek hücre zinciri (yalancı hif) oluştururlar. Gram boyama ile tüm *Candida* türleri Gram pozitif boyanır. *Candida* türlerinin mısır unlu-tween 80'li agarda, 25 °C'de 72 saatte oluşturduğu mikroskobik morfoloji (klamidospor oluşumu) ve Sabouraud dekstroz agardaki (SDA) koloni morfolojisi tür tanısında önem taşır. *Candida* türlerinde, en iyi üreme pH 4.5–5.0 arasındadır; ancak, pH 3.0-7.5 arasında üreyebilen türleri de bulunmaktadır (Tuckfield ark., 1943).

SDA gibi besiyerlerinde oda sıcaklığında ve 37°C'de 24 saatte, genellikle kirli beyaz veya krem renğinde, yumuşak kıvamlı ve tipik olarak mayamsı kokulu koloniler oluşturarak ürerler. *C. albicans* SDA'da 25°C'de beyaz-krem renğinde, yumuşak, pürüzsüz ve buruşuk görünümlü koloni oluşturarak ürer. Serum içinde 37°C'de 2 saat inkübe edildiğinde *C. albicans* türleri gerçek hif oluşturmakta olup ana hücreden boğum oluşturmada borucuk şeklinde uzayarak "germ tüp" adı verilen yapıyı oluşturur. *C. glabrata* SDA'da; beyaz, düzgün, parlak koloniler yapar. *C. tropicalis* SDA'da; beyaz-krem renğinde, hifal sınırları olan koloniler oluşturur. *C. parapsilosis* SDA'da; beyaz, kaymaksı, parlak, düzgün veya buruşuk koloniler yapar. Tipik olarak kavisli ve geniş, dev hücre denen hifal elementler içerir. *C. krusei* SDA'da; düzgün sınırlı, yuvarlak uçlu, beyaz koloniler oluşturur. *C. guilliermondii* SDA'da; nemli, düzgün, krem renğinde koloniler meydana getirir (Sutton, 1998; Tümbay, 1999).

Biyofilm oluşumu: Herhangi bir yabancı cisim implantasyonundan sonra tükürük, mukus, serum veya kan gibi yabancı cismi çevreleyen vücut sıvılarındaki çeşitli makro moleküller (fibrinojen, fibronektin, kollojen ve laminin vb.) yüzey üzerinde birikerek “hazırlayıcı film” oluştururlar. Ekzopolimerler bu makro moleküllerin oluşturduğu film tabakasını sararak glikokaliks (slime) denen tabakayı oluştururlar. Mikroorganizmalar bu slime tabakası içinde çoğalarak kalın bir film tabakasının oluşumuna neden olurlar. *Stafilokoklar* ve bazı *Candida* türleri slime benzeri yapılar oluşturan başlıca mikroorganizmalardır (Pascual, 2002). *Candida* türlerinin yabancı cisimlere slime faktörü aracılığı ile tutunması sonucunda hem sürekli bir enfeksiyon odağı gibi rol oynar

hem de vücudun savunma mekanizmalarından ve antifungal tedavinin etkisinden kurtulabilir. *Candida* türlerinin slime faktörü oluşturması mantarın virulans faktörüdür. Yabancı cisimler ile ilişkili fungal enfeksiyonların çoğundan *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* sorumludur (Pitted ve ark., 1997).

Oral kavitede en sık izole edilen tür *C. albicans*'tır ve tüm izole edilen organizmaların %80-90'ını oluşturur (Stafford ve Handley, 1975). Oral floradan izole edilen diğer *Candida* türleri *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* ve *C. guilliermondii*'dir (Samaranayake, 1986). *C. albicans*'ın ağız bölgesindeki en sık saptandığı bölge dilin dorsumu olup sırasıyla diş yüzeyleri ve mukozada bulunur. *Candida* türleri vücutta, sindirim sisteminin bazı bölgeleri ile vajina boşluğunda zararsız olarak bulunur. HIV enfeksiyonu, bağışıklık sisteminin baskılandığı kemoterapi uygulamalarında *Candida* türleri fırsatçı enfeksiyonlara neden olur (Golecka ve ark., 2006). *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar için diğer hazırlayıcı faktörler arasında beslenme bozukluğu, endokrin disfonksiyonu, sigara ve alkol kullanımı (Ritchie ve ark., 1969; Budtz-Jørgensen, 1990; Maruo ve ark., 1999; Dorko ve ark., 2001), kanser ve bazı ilaçlar (Solomon ve Udani, 1973; Budtz-Jørgensen, 1990; Dorko ve ark., 2001; Barbeau, ve ark., 2003) yer alır. *Candida* enfeksiyonları mukozada etkili olan yüzeysel formdan daha ciddi invaziv forma kadar değişen şekillerde görülen kandidiyazise neden olabilir (Stafford ve Handley, 1975). Oral bölgede görülen *Candida* enfeksiyonlarında en sık *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*'ye rastlanmaktadır.

Protez kullanan hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada mantar enfeksiyonu oluşmuş 70 hastanın % 81.4'ünde *C. albicans*, %7.1'inde *C. glabrata*, % 1.4'ünde *C. tropicalis* ve *C. glabrata*, % 1.4'ünde *C. albicans* ve *C. tropicalis*, %1.4'ünde *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* belirlenirken, % 7.1'inde herhangi bir mantar türü saptanmamıştır (Figueiral ve ark., 2007).

Oral kandidiyazis

Oral kandidiyazis, ağız florasında bulunan *Candida* türlerinin artışı ile meydana gelir (Şekil 2-1). Oluşan lezyonlarda *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* ve *C. lusitaniae* izole edilmektedir.

Lezyonların %80 den fazlasını *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* oluşturmaktadır (Tindall ve Odds, 1988). Oral kandidiyazisin sınıflandırılması tablo 2-1 de özetlenmiştir.



Şekil 2-1: Oral Kandidiyazis (Prof. Dr. Meral Ünür 'ün arşivinden)

Tablo 2-1:Oral kandidiyazisin sınıflandırılması (Unur ve Doğan-Onur, 2003; Tarçın, 2011)

Primer Oral Kandidiyazis	Sekonder Oral Kandidiyazis
A) Akut	Sistemik mukanoz kandidiyazisin oral bulguları
- Psödomembranoz	
- Eritematöz (atrofik)	
B) Kronik	
- Atrofik	
- Hiperplastik	
C) <i>Candida</i> ile ilgili lezyonlar	
- Median rhomboid glossitis	
- Angular şelitis	
- Protez stomatitisi	
D) <i>Candida</i> tarafından süper enfekte keratinize primer lezyon	
-Liken planus	
-Lokoplaki	
-Lupus eritematosus	

Oral kandidiyazisin sınıflandırılması çeşitli şekillerde yapılabilmektedir. Klinikte karşılaştığımız tablolara göre en uygun bulduğumuz sınıflandırma Tablo 2.1 de belirtilmiştir.

1. Primer oral kandidiyazis

a. Akut tip

- i) Akut psödomembranöz kandidiyazis ya da pamukçuk yeni doğanların küçük bir kısmında, yaşlı bireylerin %10'unda ve bazen de AIDS'in ilk belirtisi olarak gözlenmektedir (Şekil 2-2). Klinik olarak beyaz-krem renkte non-keratotik lezyonlar şeklinde görülür ve genelde dil sırtı, yumuşak damak, dişeti, yanak mukozası ya da farinksi kaplar şekilde görülebilir. Candida lezyonları bulunduğu zeminden sıyrılarak kaldırılabilir ve geride hafif kanamalı kırmızı alanlar gözlenir (Farlane ve Samaranayake, 1989).



Şekil 2-2: Pamukçuk (Prof. Dr. Meral Ünür 'ün arşivinden)

- ii) Akut atrofik eritematöz kandidiyazis, uzun süreli steroid kullanan veya geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alan bireylerde meydana gelmektedir (Şekil 2-3). Ağızda ve dilde yanma hissi hastalarda gözlenen en belirgin şikayettir. Yanak mukozası ve damakta da candida lezyonları gözlenebilir. Dil dorsumunda mevcut olan papillerin kaybolmasıyla etkilenen yüzey parlak, kırmızı ve ağrılıdır (Farlane ve Samaranayake, 1989).



Şekil 2-3: Akut Atrofik Kandidiyazis (Prof. Dr. Meral Ünür 'ün arşivinden)

b. Kronik:

- i) Kronik hiperplastik kandidiyazis ya da kandidal lökoplakide etkilenen oral mukozada kronik beyaz plaklar gözlenmektedir (Şekil 2-4). Mevcut plaklar mukozaya sıkıca yapışık ve benekli -beyazımsı olup komissura yakınında veya dilin lateralinde görülmektedir (Farlane ve Samaranayake, 1989).



Şekil 2-4: Kronik Hiperplastik Kandidiyazis (Prof. Dr. Meral Ünür 'ün arşivinden)

- ii) Kronik eritematöz (atrofik) kandidiyazis: Protez stomatiti başlığı altında anlatılacaktır.

c. *Candida* ile ilgili lezyonlar

- i) Median rhomboid glossitis, eritemle karakterize, circumvallat papillaların önünde, dil dorsumunun posterior orta hattında, filiform papillaların atrofisiyle karakterize eliptik ya da romboid görünümde lezyondur (Şekil 2.5). Sigara kullanımıyla ilişkili olduğu ve steroid spreyi kullananlarda sıklıkla olduğu bildirilmiştir (Arendorf ve Walker, 1984; Tarçın, 2011).



Şekil 2-5: Median Rhomboid Glossit (Prof. Dr. Meral Ünür ‘ün arşivinden)

- ii) Angular şelitis, kişilerin ağız köşelerinde rastlanan, sıklıkla kronik atrofik kandidiyazis lezyonlarının bir komplikasyonu olarak görülmekle birlikte herhangi bir oral kandidiyazis tipiyle ilişkili olabilmektedir (şekil 2.6). Etiyolojisinde dikey boyutu düşük olan protezlerin kullanılması, ağız köşelerinde yaşa bağlı kırışıklıkların varlığı, demir eksikliğine bağlı anemi ve vitamin B₁₂ eksikliği bulunmaktadır. Ayrıca AIDS'in oral belirtisi olarak sıklıkla karşılaşılmaktadır.



Şekil 2-6: Angular Şelitis (Prof. Dr. Meral Ünür'ün arşivinden)

2.1.2.2. Protez stomatiti

Kronik atrofik eritematöz kandidiyazis ya da protez stomatiti; hastaların kullandığı tam ya da bölümlü protezin oturduğu mukozada meydana gelen enflamasyondur. Genelde semptom vermeyen protez stomatiti mukozada yanma hissi, kaşıntı, kanama ve koku şikayetine sebep olabilir (Arendorf ve Walker, 1987; Williams, 2008).

Protez stomatiti genellikle yaşlı bireylerde gözlenir ve tam protez kullanıcılarının % 35-50'sinde meydana gelebilir (Cumming ve ark., 1990). Yaşlılarda daha fazla görülmekle beraber yine de protez stomatiti ile yaş dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Kulak ve Arıkan, 1993; Bilhan ve ark., 2005).

Kadınlarda erkeklere göre daha yaygın olarak gözlenir (Arendorf ve Walker, 1979; Alkumru ve Beydemir, 1992; Pires ve ark., 2002; Bilhan ve ark., 2003; 2005) ve bunun nedeni olarak da endokrin eksiklikler, vajinal *Candida* taşıyıcılığı ve demir eksikliği anemisi gösterilmiştir (Davenport, 1970; Bilhan ve ark., 2005). Ayrıca çalışmaların bir kısmı protez stomatitinin kadınlarda daha sık oluştuğunu bildirirken (Mikkonen ve ark., 1984; Bayraktar ve ark., 1997; Nevalainen ve ark., 1997; Kovac-Kovacic ve Skaleric, 2000; Emami, ve ark., 2008; Dağıstan ve ark., 2009) protez stomatiti ile cinsiyet arasında herhangi bir ilişki bulamamıştır (Verran ve Maryan, 1997; Khasawneh ve al-Wahadni, 2002; Freitas ve ark., 2008; Baran ve Nalçacı, 2009).

Protez stomatitine sahip bireylerde sıklıkla; mukozalarda kanama ve şişlik, ağız genelinde yaygın bir yanma hissi, kötü ağız kokusu, tat alma duyusunda bozukluk ve değişiklik, ağızda kuruluk gibi şikayetlerden söz edilir. Protez stomatitinin epidemiyolojisi hakkında çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Gendreau ve Loewy, 2011).

Mumcu ve arkadaşları rastgele seçtikleri 765 kişinin ağız içi muayenesini yaptığı çalışmalarında; 178'inin protez kullandığını, yalnızca %18.5'inde protez stomatitine rastlandığını bildirmiştir (Mumcu ve ark., 2005).

Muayene için kliniğe gelen ve protez kullanan bireylerde protez stomatiti görülme sıklığının incelendiği bir başka çalışmalarda %35.8 ve %70 arasında değişen değerlere ulaşılmıştır (Dikbas ve ark., 2006; Baran ve Nalçacı, 2009; Dağıstan ve ark., 2009).

Protez stomatiti lezyonlarının oluşmasında *Candida* türü mantarların protez yüzeyine tutunmasının önemli bir etkisi bulunmaktadır (Campos ve ark., 2008). Hijyen açısından eksik olan protezlerin yüzeyinde biyofilm tabakası oluşmakta ve protez yüzeyinde patojenik plağa dönüşmektedir (Coulthwaite ve Verran, 2007). Protez yüzeyindeki pürüzlülük ve mikro çatlaklar nedeniyle *Candida* türleri biyofilm oluşturan diğer mikroorganizmalar gibi protez yüzeyine kolayca yapışmaktadır (VandenAbbeele ve ark., 2008).

Protez yüzeyindeki *Candida* türleri aynı zamanda oral mukozada da kolonize olabilmektedir. Uygun şartlar altında oral mukozada kolonize olan *Candida* türlerinin epitel invazyonu ile birlikte protez stomatiti lezyonları oluşmaktadır (Coulthwaite ve Verran, 2007).

Protez stomatiti, tam ve bölümlü protezlerin zemininde, genellikle palatinal mukozada kronik olarak meydana gelen yaygın ve eritemli alanlar halinde gözlenen iltihabi değişikliklerdir. Oluşan eritemin protez sınırları içinde kalması, önemli bir özellik olarak bildirilir (Stafford ve Handley, 1975; Martin ve Lamb, 1982; Budtz-Jørgensen, ve ark., 1988; Kulak ve Arıkan, 1993; Carlsson, 1997; Özbayrak, 2003). Protez stomatiti yaygın olarak üst damakta gözlenir (Şekil 2.7). Alt damakta üst damak kadar yaygın gözlenmemesinin nedeni, alt damağın anatomik olarak ince olması, yapılan hareketli protezlerin sıkı sıkıya mukozayı örtememesi ve tükürüğün yıkayıcı özelliğinin alt çenede daha belirgin olmasıdır. *C. albicans* oral lokalizasyonu açısından, dil dorsumundan diğer bölgelere oranla daha fazla izole edildiği ve bu nedenle dil dorsumunun oral *C. albicans* açısından depo görevi gördüğü yolundaki iddialar çeşitli çalışmalar ile desteklemiştir (Arendorf ve Walker, 1979; Alkumru ve Beydemir, 1992).

Protez kullananların %11-67'sini etkileyen protez stomatiti, tam protez kullanan bireylerde parsiyel protez kullanan bireylere göre daha fazla görülmektedir (Alkumru ve

Beydemir, 1992). Hastaların %28-78'inin oral şikayetleri var iken bazı hastalar durumdan habersizdir (Kulak ve Arıkan, 1993; Özbayrak, 2003).

Protez stomatitini histolojik olarak incelediğimizde; keratin tabakasında azalma ya da tamamen ortadan kalkma, atrofik ve gevşek bir epitel görüntüsü, bazal tabaka civarında ve bağ dokusunda plazma hücreleri ile lenfosit infiltrasyonu gözlenir. Oluşan tablo enfeksiyonun mukoza içine yayılması şeklinde değil daha çok protez iç yüzeyini zemin olarak kullanan mikroorganizmaların üremesiyle gelişir (Özbayrak, 2003).

Protez stomatitinin etiyolojisi multi faktöriyeldir. Etiyolojide yer alan lokal ve sistemik faktörler değerlendirilerek tedavi planlaması yapılmalıdır (Gendreau ve Loewy, 2011). Mikrobiyal dental plak varlığı, proteze bağlı faktörler, tükürüğün özellikleri ve travmalar lokal etiyolojik faktörler olarak belirtilmektedir. *Candida* türü mikroorganizmalar, yeterli olmayan ağız ve protez hijyeni, sigara- alkol kullanımı, karbonhidrattan zengin beslenme alışkanlığı gibi lokal etkenler ve proteze bağlı gözlenen travmatik sebepler protez stomatitinin etiyolojisinde önemli yer tutmaktadır (Salerno ve ark., 2011). Protez stomatitindeki sistemik faktörler ise diyabet, yüksek karbonhidrat tüketimi, ksero stomi, kan hastalıkları, HIV enfeksiyonu, demir eksikliği, B₁₂ vitamini eksikliği, hipotiroidizm, adrenokortikal yetmezlik, kortikosteroid kullanımı, kemoterapi, immunosupresyon, neoplazmalar, anemi olarak bildirilmiştir (Davenport 1970; Olsen, 1974; Budtz-Jørgensen ve ark., 1975; Arendorf ve Walker, 1979; Renner ve ark., 1979; Samaranayake, 1986; Fouche ve ark., 1987; Farlane ve Samaranayake, 1989; Kulak ve Arıkan, 1993; Carlsson, 1997; Saki ve ark., 1997; Webb ve ark., 1998; Yücesoy ve Balış, 1998; Ak ve ark., 1999 Tokman ve Oygür, 1999; Pietruski ve ark., 2000; Dorko ve ark., 2001; Kulak-Ozkan ve ark., 2002; Bilhan ve ark., 2003; 2005; Milillo ve ark., 2005; Monroy ve ark., 2005; Natto ve ark., 2005; Shulman, ve ark., 2005; Tezal ve ark., 2005).

Mukozadan ve protez iç yüzeyinden alınan smear ve kültürlerde genellikle *C. albicans* türü mantarlara rastlanılmıştır. Hasenclever ve Mitchell 1963 yılında *C. albicans*'a ait 2 farklı serotip bulmuşlar ve bu serotipleri A ve B olarak adlandırmışlardır. Yapılan araştırmalarda protez stomatitinde serotip A'nın serotip B'ye göre daha fazla bulunduğu bildirilmiştir (Martin ve Lamb, 1982).

Candida enfeksiyonlarının tedavisinde genel olarak 2 haftalık bir tedavi süresi kabul edilmiştir (Kulak-Ozkan ve ark., 2002; Bilhan ve ark., 2003; Figueiral ve ark., 2015). Protez stomatitinin tedavisinde öncelikle protez hijyenine dikkat edilmeli, devam eden ve inatçı lezyonlarda topikal ya da sistemik antifungal ilaç kullanılmalıdır. Protez stomatiti ile ilişkili *Candida* lezyonlarının tedavisinde nistatin, amfoterisin B ve mikonazol tercih edilen topikal antifungallerdir. Daha dirençli olgularda ise, triazoller kullanılabilir. İlk tercih edilen triazolun flukonazol olduğu; ancak yapılan çalışmalarda flukonazolün kısa dönemde iyi bir antifungal ilaç olduğu; uzun dönemde ise flukonazole direnç geliştiği bildirilmiştir (Figueiral ve ark., 2015).



Şekil 2-7: Protez stomatiti (Prof. Dr. Meral Ünür 'ün arşivinden)

2.1.2.3. Antifungal ilaçlar

Mantar enfeksiyonları sistemik ve yüzeysel olarak ikiye ayrılır ve kronik bir seyir izler. Sistemik mantar enfeksiyonları vücudun iç organlarını kapsayan derin yerleşimli lezyonlardır. Yüzeysel mikozlardan daha nadir görülmesine rağmen hayatı tehdit edebilirler. Tedavileri zor ve uzundur. Yüzeysel mantar enfeksiyonları *Candida* türü veya dermatofit gurubu mantarlarla meydana gelir. *Candida* cinsi mantarlar ağız boşluğu,

barsak, anüs, parmak arası gibi ıslak cilt bölgelerinde mukozalarda normal flora üyesi olarak bulunurken, dermatofit grubu mantarlar deri, saç, tırnak gibi bölgelerde enfeksiyon etkeni olarak yer alır. Özellikle *Candida* cinsi mantarların neden olduğu yüzeysel ve sistemik enfeksiyonların sıklığı son yıllarda oldukça artmıştır. Bu durumun nedenleri arasında sitotoksik ve/veya immunosupresif tedavi altındaki hasta sayısındaki artış, HIV gibi enfeksiyonların yanısıra bağışıklık sisteminin zayıflaması, diyabet gibi faktörler de yer alır.

Oral mukozayı etkileyen en yaygın mantar enfeksiyonu kandidiyazistir. Pseudomembranöz, eritematöz, hiperplastik ve angular şelitis tiplerinde farklı klinik görünümmler olabilir. Fungal enfeksiyonlar, topikal ve sistemik olarak tedavi edilmektedir (Tablo 2-2). Topikal ajanlar; tablet, gargara, krem vajinal tablet gibi şekillerde kullanılabilir. Ağız kuruluğu olan bireylerde tablet kullanılmasının zor olması sebebiyle gargara formu tercih edilebilir (Dural, 2002).

ANTİFUNGALLER

İnvaziv mikoz tedavisinde antifungallerin etki mekanizması dört farklı temele dayanır:

- 1) Ergosterol biyosentezinin inhibisyonu (azoller)
- 2) DNA veya RNA sentezinin inhibisyonu (flusitozin)
- 3) Glukan sentezinin inhibisyonu (ekinokandinler)
- 4) Membran fonksiyonunun değişmesi (amfoterisin B) (Yeğenoğlu, 2012)

Tablo 2-2: Antifungallerin kullanım şekillerine göre sınıflandırılması; (Topçu Willke, 2002)

A. Sistemik olarak kullanılan ilaçlar	B. Topikal olarak kullanılanlar ilaçlar
1. Poliyen Amfoterisin B	Nistatin
2. Primidin Flusitozin	
	3. Griseofulvin
4. Azoller	
İmidazoller Ketokonazol	Mikonazol
Triazoller Flukonazol İtrakonazol	
	5. Alilamin Terbinafin

A. Sistemik Antifungaller

I) AMFOTERİSİN B

Streptomyces nodosus' dan elde edilmiş poliyen makrolid bir antifungaldir. Duyarlı mantarların hücre zarındaki sterollerden ergosterole bağlanarak membranın geçirgenliğini değiştirir. Böylece mantarın gelişimi için önemli olan elemanlar (K iyonu) hücre dışına çıkar. Kolesterol gibi sterollere daha az bağlandığı için, fungusid etkisi seçicidir. Amfoterisin B geniş spektrumlu bir antifungaldir. *C. albicans*, *Cryptococcus* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatidis*, *Aspergillus* spp. türleri gibi çok sayıda mantara karşı etkilidir. Yaşamı tehdit eden yaygın mantar enfeksiyonlarının hepsinde kullanılabilen, doza bağlı olarak fungusid ya da fungostatik etki gösteren,

sistemik ve lokal kandidiyazisin tedavisinde oldukça başarılı olan bir ilaçtır. Sistemik olarak parenteral yolla kullanılmaktadır. Deri ve muköz membranlardan emilimi bulunmamaktadır. Plazma proteinlerine %90 oranında bağlanarak karaciğerde metabolize olur ve idrardan uzun sürede atılır. Eliminasyon yarı ömrü 15 gündür. İntravenöz infüzyon şeklinde %5 glikozla, günde 0.5-1 mg/kg dozda, 4 saat veya üzerinde uygulanır. Cilt ve mukozaların yüzeysel mantar enfeksiyonlarında losyon, krem, merhem şeklinde kullanılır (Richardson ve Jones,2001).

II) FLUSİTOZİN

Aktivitesi amfoterisin B den daha düşüktür. Direnç gelişimi görülebilir. Bu nedenle amfoterisin B ile kombine edilerek kullanılır (Richardson ve Jones,2001).

III) GRİSEOFULVİN

Dermatofit gurubu mantarlara etkilidir. Diğer türlerde etkisi bulunmamaktadır. Tedavide nadiren tercih edilir (Dural, 2002).

IV) AZOLLER

Antifungal aktivitesindeki mükemmellik, geniş etki spektrumu ve yan etkilerde görülen azlık sebebiyle klinik olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar. İlk defa Wooley tarafından 1944'te sentezlenmiştir. Mantar hücre duvarının yapısal elemanlarından biri olan ergosterol biyosentezinde görevli C14 lanosterol demetilaz enzimini inhibe ederek aktivite gösterir (Yeğenoğlu, 2012).

1. KETOKONAZOL: Amfoterisin B ye alternatif olarak üretilmiş oral antifungal ilaçtır. Sistemik mantar enfeksiyonlarında kullanılır. Genelde fungistatiktir; ancak doza bağlı olarak fungisidal etki gösterebilir. Pulmoner ve yaygın histoplazmozis, blastomycosis, orofaringeal kandidiyazis, kronik mukokutanöz kandidiyazisde etkilidir. Oral yoldan alındığında gastrointestinal emilimi hızlıdır. Biyoyararlanımı mide pH'ına bağlı olup asidik pH'da emilimi iyidir. Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanarak safra ile atılır ve eliminasyon yarı ömrü 8 saattir. Oral ve topikal kullanıma özgü preparatları vardır. Oral olarak günde 1-

2 kez 200 mg kullanılabilir. Oral kandidiyazis tedavisinde kullanılabilir; ancak toksik etkisi nedeniyle topikal olarak nistatine direnç gösteren olgularda tercih edilmelidir (Richardson ve Jones,2001; Topçu Willke, 2002).

2. MİKONAZOL: Sistemik fungal enfeksiyonların tedavisinde parenteral olarak kullanılır, ancak toksik etkisi nedeniyle bu yol tercih edilmez. Gastrointestinal enfeksiyonlarda oral olarak kullanımı söz konusudur. Topikal kullanım için krem, losyon, sprey şeklinde preparatlar var olup topikal uygulamayla oral kandidiyazis, vulvovaginal kandidiyaziste başarılı sonuçlar alınmaktadır(Richardson ve Jones,2001; Topçu Willke, 2002).
3. FLUKONAZOL: İmmun sistemi yetersiz veya baskılanmış hastalarda meydana gelen fungal enfeksiyonlarda başarılıdır. Oral veya parenteral olarak uygulanır (Tablo 2-3). Oral yoldan emilimi hızlı ve biyoyararlanım oranı yüksektir. Ketokonazolden farklı olarak mide pH'ı biyoyararlanımı etkilemez. Karaciğerde metabolize olma oranı düşüktür. Eliminasyon yarı ömrü uzundur. Mukozal kandidiyaziste oral yolla günde 50-100 mg 7-14 gün süreyle kullanılır. Sistemik kandidiyaziste ise oral veya intravenöz infüzyonla 200-400 mg günde 1 kez kullanılır (Richardson ve Jones,2001; Topçu Willke, 2002).
4. İTRAKONAZOL: Ketokonazolden geniş spektruma sahiptir ve yan etkisi daha azdır. Orofaringeal, özofageal ya da vaginal kandidiyaziste, blastomyces ve histoplasmosiste griseofulvine dirençli dermatofitlere etkilidir (Tablo 2-3). Oral yoldan iyi emilir. Plazma proteinlerine %90 oranında bağlanır. Karaciğerde metabolize olur, eliminasyon yarı ömrü 30 saattir. Oral yoldan günde 2 kez 100-200 mg dozlarda kullanılır (Richardson ve Jones,2001; Topçu Willke, 2002).

B. Topikal antifungaller

I) NİSTATİN

Streptomyces nourse kültürlerinden izole edilmiş, poliyen grubundan bir antifungaldir. Yapı ve etki mekanizması amfoterisin B'ye benzer, ancak daha az etkilidir.

Gastrointestinal sistemden emilimi düşük ve toksisitesi yüksektir. Toksisitesinin yüksek olması nedeniyle cilt, ağız, özofagus, barsak ve vajinanın *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde topikal olarak kullanılır. Diş hekimliğinde en sık kullanılan antifungal ilaçlardandır. Oral moniliasis, protez stomatiti, yenidoğan pamukçuğu gibi ağız boşluğunda görülen *Candida* enfeksiyonlarında tercih edilir. Oral, vaginal tabletler, ağız gargarası, merhem, toz şeklinde preparatlar mevcuttur. Oral kandidiyaziste mililitrede 100000 ünite nistatin içeren süspansiyonlar kullanılır (Tablo 2-3). En az 10 gün kullanılır ya da belirtilerin kaybolmasından sonra 48 saat boyunca 6 saatte bir tekrarlanır. Oral tabletler de kullanılabilir. Protez stomatiti hastalarında nistatin içeren merhem 6 saat arayla protezin dokuya temas ettiği bölgeye uygulanır, ihtiyaç halinde tekrarlanır. Protez stomatitinde en fazla tercih edilen topikal preparattır. Gargara formu günde 3 kez 2 şer damla şeklinde uygulanır (Richardson ve Jones,2001; Dural, 2002).

Tablo 2-3: Oral kandidiyazisin tedavi seçenekleri (Dural, 2002; Topçu Willke, 2002)

UYGULAMA	İLAÇ	KULLANIM
Topikal ekstraoral	<i>Klotrimazol</i> krem %1	Günde 4 kez
	<i>Mikonazol</i> krem %2	Günde 4 kez
	<i>Ketokonazol</i> krem %2	Günde 4 kez
	<i>Nistatin</i> krem 100000 I.U.	Günde 4 kez
Topikal intraoral	<i>Klotrimazol</i> oral tablet 10mg	Günde 5 kez (10gün)
Topikal	<i>Nistatin</i> oral tablet 200000 I.U./ml	Günde 4-5kez 10 gün
Topikal	<i>Nistatin</i> oral süpansiyon 100000 I.U./ml	Günde 4 kez çalkalama
Topikal	<i>Nistatin</i> vajinal tablet 100000 I.U./ml	Günde 6-8 kez
Sistemik	<i>Ketokonazol</i> oral tablet 200mg	2 tb sonrası günde 1 tb
Sistemik	<i>Flukonazol</i> 100 mg	2 tb sonrası günde 1 tb

Oral kandidiyazise neden olabilecek durumlar:

- I) İlaçlar: Geniş spektrumlu antibiyotikler, antibiyotik kombinasyonları, kortikosteroidler, sitotoksik ajanlar, antidepresanlar, immunsupresanlar, antikolinerjikler
- II) Endokrin sistem bozuklukları: Diabetes mellitus, hipoadrenalizm, hipotiroidizm, hipoparatiroidizm, poliendokrinopati
- III) Hematolojik hastalıklar: Aplastik anemi, agranulositoz, lenfoma, lösemi
- IV) İmmün yetmezlik sendromları: HIV enfeksiyonları, hiperimmünglobulinemi sendromu, ciddi kombine immün yetmezlik sendromu
- V) Lökosit hastalıkları: Myeloperoksidaz yetmezliği, agranulositoz, lökopeni, nötropeni
- VI) Malignite: Lösemi, lenfoma, ilerlemiş kanser
- VII) Beslenme yetersizliği: Demir eksikliği, folik asit eksikliği, biotin eksikliği, vitamin B, vitamin C eksikliği, malabsorbsiyon
- VIII) Diğer durumlar: Radyasyon tedavisi, sjogren sendromu, gebelik, kserestomi, ilerlemiş yaş, bebeklik, protez kullanımı (Richardson ve Jones,2001; Dural, 2002; Topçu Willke, 2002)

2.1.2.4. Antifungal duyarlılık testleri

Antifungal Duyarlılık Testleri ve Klinik Önemi

Mantar enfeksiyonlarında gözlenen artış sebebiyle antifungal ilaçların kullanımlarında da artış meydana gelmiştir. Tedavi yaklaşımlarının düzenlenmesinde, alternatif ilaç arayışında ve gözlenen direnç sorunu nedeniyle standart antifungal duyarlılık yöntemleri önem kazanmıştır. Antifungal duyarlılık testleri, yeni geliştirilen ilaçların in vitro etki spektrumunu belirlemek, direnç oranlarına ait epidemiyolojik veriler elde etmek ve antifungallerle klinik izolatların in vitro duyarlılıklarını belirleyerek klinik yanıtla ilişkin öngöründe bulunmak amacıyla kullanılmaktadır (Espinel-Ingroff ve Pfaller, 2007).

Antifungal duyarlılık testi için araştırma/rutin amaçlı kullanılan yöntemler; makrodilüsyon, mikrodilüsyon, spektrofotometrik mikrodilüsyon, kolorimetrik mikrodilüsyon, agar difüzyon, agar makrodilüsyon, E test ve disk difüzyon yöntemidir. Klinik mikoloji alanında bu testlerin geliştirilmesi ve standardizasyonu oldukça önem taşır. Bu amaçla 1992'den bugüne eski adıyla National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) olarak bilinen, yeni adıyla Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) tarafından hem maya hem de küflerde standart yöntemleri tanımlamak için raporlar yayınlanmaktadır. Bu dökümanlar Food and Drug Administration (FDA) tarafından kullanılmak için düzenlenmiştir. "M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard 04/28/2008" mayaların antifungal ilaçlara olan duyarlılıklarını belirlemek amacıyla geliştirilmiş makro/mikrodilüsyon yöntemi klavuzudur ve bu klavuzun M27-S3 (Wayne, 2008) ilave güncellenmiş klavuzu bulunmaktadır. M27-S3 versiyonunun en önemli önerisi flukonazole ait minimum inhibitör konsantrasyon (MİK, µg/ml) değerlerinin 24 saatte okunabilecek olmasıdır. Ancak, bu öneriyle birlikte, flukonazol MİK değeri <32 µg/ml olan *C. glabrata* suşlarında flukonazolün maksimum dozda kullanılması gerektiği dikkate sunulmuştur. CLSI 2012 yılında antifungal duyarlılık deneylerinde yeniden değerlendirme yaparak son versiyon olan M27-S4 klavuzunu yayınlamıştır. Bu klavuza göre; mikrodilüsyon yönteminde azol grubu antifungaller için MİK değerlerinin 24 saat sonrasında değerlendirilmesi gerektiği, en yaygın beş *Candida* türü için, türe özgü farklı MİK sınır değerleri (breakpoints) belirlenmiştir. Azol grubu antifungaller için belirlenen sınır değerleri Tablo 2.4'de görülmektedir. M27-S4 klavuzunda itrakonazol için MİK sınır değeri verilmediği için M27-S3 deki sınır değerler geçerliliğini devam ettirmektedir (Tablo 2.5).

Tablo 2-4: CLSI M27-S4'e göre azollerin 24 saatlik inkübasyon sonrasında MİK (µg/ml) değerleri (CLSI M27-S4, 2012)

Antifungal Madde	Türler	MİK aralığı		
		D	DBD	R
Flukonazol	<i>C.albicans</i>	≤2	4	≥8
	<i>C.glabrata</i>	-	≤32	≥64
	<i>C.krusei</i>	-	-	-
	<i>C.parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
	<i>C.tropicalis</i>	≤2	4	≥8
Vorikonazol	<i>C.albicans</i>	≤0.12	0.25-0.5	≥1
	<i>C.glabrata</i>	-	-	-
	<i>C.krusei</i>	≤0.5	1	≥2
	<i>C.parapsilosis</i>	≤0.12	0.25-0.5	≥1
	<i>C.tropicalis</i>	≤0.12	0.25-0.5	≥1

D: Duyarlı, DBD: Doza bağlı duyarlı, R: Dirençli

“M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard 04/28/2008” ise küf mantarlarının antifungal ilaçlara karşı olan duyarlılıklarını belirlemek amacıyla geliştirilmiş mikrodilüsyon yöntemidir. “M44-A2 Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline- 08/28/2009” Candida türlerinin flukonazole ve vorikonazole duyarlılığını belirlemek amacıyla kullanılabilen bir disk difüzyon yöntemidir. Antifungal duyarlılık testleri için 1997 yılında “The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases” (ESCMID), “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST)’i oluşturmuştur. 2002 yılında EUCAST yeniden yapılandırılmış ve bugünkü şeklini almıştır.

Referans yöntemlere alternatif olabilecek daha kolay, ucuz, tekrarlanabilir, kullanılabilirliği yüksek ve uygun yöntemlerin arayışı devam etmektedir. Bunlar arasında en sık kullanılan yöntemler; e-test, integral system yeasts antifungal disk, Candifast,

Fungitest, Vitek 2, Mast group antifungal disk, Rosco neosensitive disk test, BD Phonix, yeastone, ATB fungus 2, Mycostandard, Mycototal, ASTY colorimetric panel Biomic® vision sistem ve yanında araştırmacıların standart yöntemleri modifiye ettiği veya yeni yöntemler ile çalışmalar literatürlerde görülmektedir (Courvalin ve ark, 1985; Lee ve Kommary L, 1976).

Antifungal duyarlılık testleri, antifungal bir ilacın bir maya türüne karşı duyarlılığını in-vitro olarak saptamak amacıyla yapılan testlerdir. Klinikte antifungal duyarlılık testlerinin sonuçları baz alınarak tedavi şekli seçilir; ancak her zaman test sonuçları beklenmeden ampirik tedavi uygulanabilir.

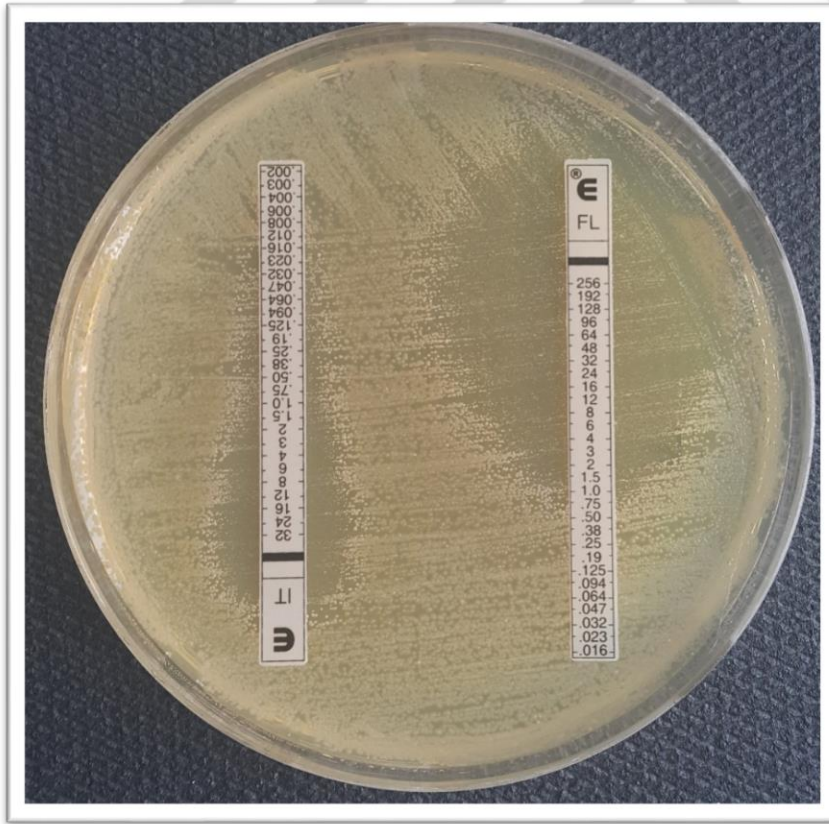
a. Difüzyon testi

Disk difüzyon testi

Antibiyotik duyarlılığının saptanmasında laboratuvarlarda en sık kullanılan yöntem disk difüzyon testi yöntemidir. Kirby Bauer tarafından geliştirilmiş olan ucuz ve uygulaması kolay bir yöntemdir. Bu testte duyarlılığı araştırılacak olan mikroorganizmanın besiyerine ekilmesi, kağıt disklere emdirilmiş olan antibiyotikğin besiyerine difüze olması ve inkübasyon sürecinin tamamlanması temeline dayanır. Inkübasyon süresinin tamamlanmasıyla inhibitör konsantrasyonunun sağlandığı diskin çevresinde üreme meydana gelmez. Üremenin gözlenmediği bu alan mikroorganizmanın ilaca karşı olan duyarlılığıyla ilgilidir. Duyarlılık ne kadar çoksa disk etrafındaki inhibisyon zonu da o kadar geniş olacaktır. Zon çapı ölçülerek standart tablolara göre değerlendirilir. Disk difüzyon testi yönteminde, ilgili mikroorganizma ‘trypticase soy buyonunda’ 37 °C de 2 saat süreyle inkübe edilir. Bulanıklık meydana geldikten sonra McFarland 0.5 (10^8 CFU/ml) göre ayarlanarak standart bir bulanıklık meydana getirilir. Oluşan süspansiyondan steril eküvyon ile alınan örnek Mueller Hinton agar yüzeyine inokule edilir. Antibiyotik diskleri pens aracılığıyla agar yüzeyine yerleştirilir. Disklerin birbirini etkilememesi için diskler arasında 22mm, Petri kutusu kenarından 14mm mesafe olmalıdır. Besiyerlerinin 35°C’de 18 ila 24 saat süre ile inkübasyonu sağlanarak meydana gelen zonlar ölçülür (Koç ve ark., 2000; CLSI M27 A-3,2008; CLSI M27 S-3,2008; CLSIM27-S4, 2012).

E test

E test (AB Biodisk, Solna, Sweden) agar bazlı bir yöntem olup plastik striplerden antimikrobiyal ajanların gradient konsantrasyonlarında difüze olduğu antibiyotik duyarlılık testidir. Bir mikroorganizmanın üremesini engelleyebilen en düşük ilaç konsantrasyon değeri o bakteriye ait MİK değeri olarak tanımlanır. Bu yöntemde bakteri McFarland 0.5 yoğunluğa getirilip Mueller Hinton agar yüzeyine yayılır. Belli bir antibiyotik yoğunluğuna sahip E-test şeritleri agar yüzeyine yerleştirilir. Petrilerin 35°C’de 18-24 saat süreyle inkübasyonu sağlanarak MİK değerleri belirlenir. E-test şeritlerinin etrafında gözlenen inhibisyon zonunu, şeridin üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta o bakteriye ait MİK değerini vermektedir (Şekil 2-8) (Koç ve ark., 2000; (CLSI M27 A-3,2008; CLSI M27 S-3,2008; CLSIM27-S4, 2012).



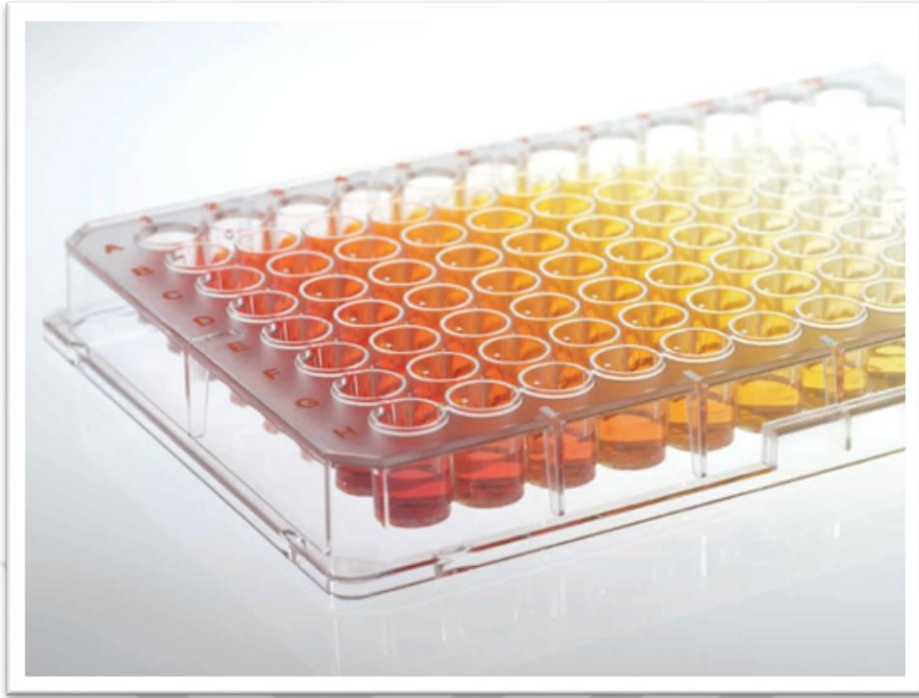
Şekil 2-8: E test şeritlerinin görünümü

Amfoterisin B, flusitozin, kaspofungin, flukonazol, vorikonazol, posakonazol ve itrakonazol için ticari olarak satılan E test stripleri bulunmaktadır. E test yöntemi ile endpoint belirlemenin, bazı suşlarda zor olmakla birlikte birçok *Candida* suşu için standart yöntemlerle uyumlu olduğu kabul edilmiştir. Yapılan bir araştırmada *Candida* suşlarının duyarlılığı E test antifungal duyarlılık testi ve referans yöntem ile karşılaştırılmış, amfoterisin B için %93.1 ketokonazol için %85.2, itrakonazol ve flukonazol için %82.3 uyum bildirilmiştir (Koç ve ark., 2000; CLSI M27 A-3,2008; CLSI M27 S-3,2008; CLSIM27-S4, 2012).

b. Dilüsyon testi

Tüp dilüsyon

Temelde aynı prensibe dayalı makro ve mikro olarak iki tüp dilüsyon yöntemi bulunmaktadır. Makrodilüsyon yöntemi antifungal duyarlılık belirlemede altın standart olarak bilinirse de uygulaması oldukça zordur. Bu nedenle makrodilüsyon yönteminden uzaklaşmış ve mikrodilüsyon yöntemi daha yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Makrodilüsyon yönteminde test tüpleri kullanılırken, mikrodilüsyonda 96 kuyucuklu ‘U’ ya da ‘V’ tabanlı mikropaklar kullanılır (Şekil 2.9). Besiyeri olarak RPMI 1640 tercih edilir. Testi yapılacak olan antifungal maddelerin öncelikle özel çözücülerde stok çözeltileri hazırlanır, ardından besiyerinde hedeflenen son konsantrasyonun iki katı olacak şekilde RPMI 1640 ile sulandırımı yapılır. Mikroorganizmaya ait standardize edilmiş bir inokulum antifungal maddenin farklı dilüsyonlarını içeren tüplere eşit olarak eklenir. Ayrıca deney koşullarının uygunluğunu denetlemek amacıyla pozitif kontrol (yalnız besiyeri ve mikroorganizma) ve negatif kontrol (yalnız besiyeri) tüpleri hazırlanır. Besiyerleri 35 °C’de bir gece inkübe edildikten sonra tüplerin bulanıklığı incelenir. MİK değeri deney tüplerinde üremenin olmadığı, gözlenebilir bir bulanıklığın bulunmadığı en düşük miktardaki ilaç konsantrasyonudur (CLSI M27-A3,2008; CLSI M27- S3, 2008; Er, 2011).



Şekil 2-9: 96 kuyucuklu ‘U’ tabanlı mikropalak

Agar dilüsyon

Agar dilüsyon prensip olarak tüp dilüsyon yöntemiyle benzerlik göstermektedir. Aralarındaki fark ise istenilen konsantrasyonda hazırlanan antifungal maddenin 45°C’lik ısıya kadar soğutulan RPMI 1640 agar içine konularak, Petri plaklarına dökülmesi ve katılaştıktan sonra kullanılmasıdır. Böylece her Petri kutusunda antifungal maddenin farklı konsantrasyonları yer alır. Test edilecek olan mayanın yoğunluğu McFarland 0.5 bulanıklığına göre ayarlanır ve 1:10 oranında sulandırılıp 10^7 CFU/ml elde edilir. Hazırlanan maya süspansiyonundan 1-2 ml agar yüzeyine inoküle edilir ve agar yüzeyinde 10^4 CFU/ml bakteri sayısı elde edilir. 35°C’de 18-24 saat süreyle plakların inkübasyonu sağlanır. Üremenin olmadığı en düşük antifungal madde konsantrasyonu o bakteriye ait MİK değerini verir. CLSI’nın antifungal ilaçlar için belirlediği MİK değerleri Tablo 2-4 ve Tablo 2-5’de gösterilmiştir. (CLSI M27 A-3,2008; CLSI M27 S-3,2008; CLSIM27-S4, 2012).

Tablo 2-5: CLSI M27-S3'e Göre MİK (µg/ml) Değerleri (CLSI M27-S3, Wayne 2008)

Antifungal Madde	D	DBD	OD	R
Amfoterisin B*	T	T	T	T
Flusitozin	≤4	-	8-16	≥32
Flukonazol	≤8	16-32	-	≥64
İtrakonazol	≤0.125	0.25-0.5	-	≥1
Vorikonazol	≤1	2	-	≥4
Kaspofungin	≤2	-	-	>2

T: Tanımlanmamış, D: Duyarlı; DBD: Doza bağlı duyarlı; OD: Orta duyarlı; R: Dirençli

* Amfoterisin B için >1 µg/ml değerler direnci ifade etmektedir.

2.1.2.5. İlaç direnci

Antifungal direnç “primer (intrinsik), sekonder (extrinsik) ve klinik direnç” olarak üç başlık altında incelenebilir. Primer direnç, antifungal temas öyküsü olmadan kalıtımla gelen dirençtir. Sekonder direnç, uzun süreli antifungal kullanımı sonucu, önceden duyarlı olan bir izolatın dirençli bir fenotip geliştirmesiyle ortaya çıkar. Klinik direnç ise laboratuvar testlerine göre hassas olduğu bilinen, antifungal maddenin kullanılmasına rağmen hastalığın ilerleyici olması ya da relaps göstermesi durumu olarak tanımlanır (Alexander ve Perfect, 1997; Karadaban, 2011).

İlaçların uzun dönemli kullanımları sonucu ilaçlara karşı direnç gelişebilir. Flukonazol, yaygın kullanımı olan, geniş etki spektrumuna sahip ve toksisitesi oldukça düşük bir antifungal ilaçtır. Yapılan farklı çalışmalarda flukonazole karşı gözlenen direnç değişen oranlarda tespit edilmiştir. Yoğun bakım ünitesinde yapılan bir çalışmada (Kuzucu ve ark., 2007), tüm *Candida* izolatlarında flukonazol direnci %14 oranında gözlenmiştir. Zepelin ve arkadaşları (2007) kandidemi etkeni suşlarda, flukonazol direnç oranını %3.7 olarak bildirmişlerdir. Diekema ve arkadaşları (2002), flukonazol direncini *C. albicans* için %3, *C. glabrata* için %10, *C. tropicalis* için %7 olarak belirlerken, Etiz ve arkadaşları (2015) flukonazol direncini toplamda %9 olarak bildirmiştir.

Poliyen türevi bir antifungal ajan olan amfoterisin B'ye karşı direnç ender görülmekle birlikte, Türkiye'deki bazı bölgelerden ve dünyanın çeşitli yerlerinden değişik oranlarda (% 2-20) amfoterisin B direnci bildirilmiştir (Zer ve Balcı, 2002; Cheng ve ark., 2004; Bayram ve ark., 2012; Öztürk ve ark., 2013). Amfoterisin B'ye en duyarlı tür *C. albicans* olup, *C. glabrata* ve *C. krusei* suşlarında *C. albicans* ile kıyaslandığında amfoterisin B'ye azalmış duyarlılık gözlenebilir.

Kaspofungin suda çözünen, semi-sentetik bir ekinokandin olup *Candida* türlerine etkinliği oldukça yüksektir. Etiz ve ark (2015) çalışmalarında kaspofungine %11 oranında direnç bildirmiştir. Bir başka çalışmada (Gültekin ve ark., 2011) kan kültüründen izole edilen 46 *Candida* spp. suşunun tamamının kaspofungine duyarlı olduğu bulunmuştur. Pfaller ve arkadaşları (2009) çalışmasında, farklı ülkelerdeki merkezlerde kandan izole edilen toplam 934 *Candida* suşunda kaspofungin için direnç oranını *C. krusei*'de %12.5 olarak bildirmişlerdir.

Pirimidin analogu bir antifungal ajan olan flusitozine karşı direnç gelişiminin oldukça yüksek olduğunu bildiren çalışmaların yanında, oldukça duyarlı olduğunu bildiren çalışmalarda vardır (Erdem ve ark., 2012).

Vorikonazol geniş spektrumlu, triazol grubundan bir antifungal ajandır. Literatürlerde test edilen tüm suşların vorikonazole duyarlı bulunduğu bildirilen çalışmaların yanında, dirençli *Candida* suşlarının rapor edildiği araştırmalar da mevcuttur (Bayram ve ark., 2012; Saraclive ark., 2009; Erdem, ve ark., 2012; Öztürk ve ark., 2013).

Antifungallere karşı gözlenen direnç nedeniyle ilaç dışı maddelere yönelim artmıştır. Bu sebeple mantarlar üzerinde etkin olduğu bilinen zeolit kullanımı gündeme gelmiştir.

2.2. ZEOLİT

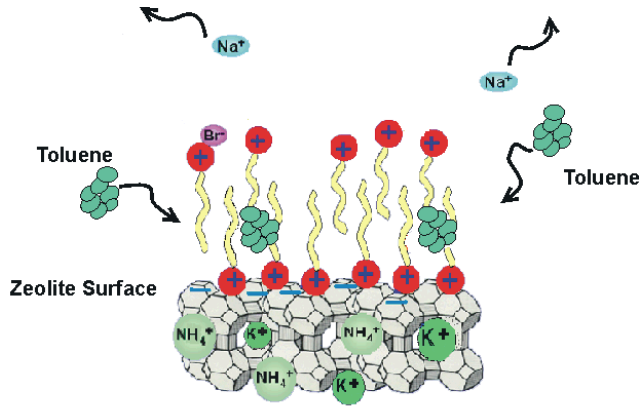
Zeolitler alkali ve toprak alkali elementlerin kristal yapısına sahip sulu alüminosilikatlardır. Zeolitin tanımı ilk kez 1756 yılında İsviçreli bilim adamı Cronstedt tarafından yapılmıştır. Doğal zeolitlerin doğada bulunup işlenmesi diğer minerallere göre daha kolay ve ucuz olduğu bilinmektedir. Ancak gözenek yapılarının istenen boyut ve çapta olmaması sebebiyle 1948 yılından beri yapay zeolitlere yönelim artmıştır. Zeolitler kullanım alanlarının çeşitliliği nedeniyle geniş pazar alanlarına sahip olmalarına rağmen kendilerine bu alanda yeni yeni yer bulmuşlardır. (Aybal, 2001; Danabaş, 2009).

Zeolit üretiminde ilk sırayı 61000 ton üretimle Japonya almıştır. Küba, Avustralya, Kanada, Amerika'da da zeolit kaynakları mevcuttur. Ülkemizde Balıkesir, Ankara (Polatlı), Kütahya, Manisa dolayları zeolit açısından oldukça zengindir. (Aybal, 2001; Danabaş, 2009).

Günümüzde 150' den fazla zeolit tanımlanmıştır. Bunlardan 40'ı doğal zeolittir. Yüzden fazla da yapay zeolit türü mevcuttur. Klinoptilolit, ferrierit, kabazit, mordenit, analsim erionit, heulandit, fillipsit ve laumontit yaygın olarak rastlanan doğal zeolit türleridir. (Aybal, 2001; Danabaş, 2009).

Yapay zeolit türleri Zeolit A, X, Y ve ZMS-5 ise olarak adlandırılmaktadır. Yapay üretimin oldukça masraflı olması sebebiyle doğal yatakların aranması çalışmalarına hız verilmiş, zengin zeolit yataklarına ulaşılmıştır (Aybal, 2001; Danabaş, 2009).

Zeolit minerali, %65-85 oranında kalsiyum sodyum alüminosilikat, %25-35 oranında magnezyum alüminosilikat ve ihmal edilebilir düzeyde kuartzdan oluşur.



Şekil 2-10: Zeolitin yapısı

Zeolitin genel formulu : “ $(M^+, M^{+2}) O \cdot Al_2O_3 \cdot 9SiO_2 \cdot nH_2O$ ” şeklindedir.

M^+ genelde Na / K / Li’ dan herhangi biri olurken M^{+2} ise Mg/Ca/ Fe / Ba / Sr ‘dan birini temsil etmektedir. Ortamda bulunan katyonlar iyon değiştirebilirler. Zeolitin iyon değiştirme özelliği nedeniyle, sanayiide iyon değiştirici olarak kullanılabilir (Şekil 2-10).

Zeolitin kafese benzeyen yapısında gözlenen kanallarda alkali katyonlar ve çok sayıda su molekülü mevcuttur (Şekil 2-11) .



Şekil 2-11: Zeolitin kafese benzeyen görünümü

Zeolit, silikat grubu minerallerin bir grubunun genel başlığıdır. Bu grup altında, doğa ve doku dostu olan (eriyonite hariç) bir dizi mineral bulunur. Minerallerin

moleküler yapısı, dörtlü yapıların halkalar halinde üç boyutlu olarak bir araya gelmesiyle oluşur. Zeolitin en küçük yapı birimi SiO_4 ve AlO_4 'dir. Yapı içinde oksijen, SiO_4 ve AlO_4 tetrahedron yapının farklı yerlerine yerleşir. Bu tarz değişik yerleşimler, mineralojik yapıda da farklılıklara sebep olur. Tetrahedron yapıların birbirine bağlanmasının oksijen atomları sayesinde olduğu düşünülmektedir. Kristalin yapı içinde doğal filtre görevi gören 0.3 – 0.8 nm çapında boşluklar mevcuttur. Moleküler boyutta olan boşlukların oldukça küçük olması sebebiyle iri partiküller kanallardan geçemez. Pek çok bakteri, mikroorganizma ya da delik çapından büyük maddeler kanallarda takılıp kalırlar. Doğal zeolitin görüntüsü Şekil 2-12'de gösterilmiştir. (Yücel, 1987; Chon & Woo, 1996; Aybal, 2001; Alp, 2005; Sarioğlu, 2005; Tepe, ve ark., 2005; Danabaş, 2009; Sentürk ve ark., 2010; Mihaly-Cozmuta, ve ark., 2014).



Şekil 2-12: 25 µm boyutlarında doğal zeolite ait görümüm

2.2.1. Zeolit oluşumu

Doğal zeolit yataklarının oluşumu ortamlarına göre sınıflandırıldığında;

- I) Tuzlu suya sahip göllerde volkanik malzemenin göl suyuyla reaksiyona girmesi,
- II) Açık göllerde (Tatlı veya tuzlu) volkanik maddenin birikip göl suyu ile kimyasal reaksiyonu,
- III) Derin denizde volkanik maddenin deniz suyuyla reaksiyona girmesi,
- IV) Düşük ısıli gömölme metamorfizması sonucunda, Al-Si'lu sedimanter ya da volkanik maddelerden,
- V) Sıcak kaynak sularının hidrotermal ya da Al-Si'lu malzemeye etkisi ile bu maddenin bozulması,
- VI) Genelde 2. zaman tortulları arasında gözlenen ve orijinlerinin volkanik olup olmadığının belirlenemediği, denizel veya gölsel ortamlarda oluşan zeolit yatakları şeklinde oluşabilirler (Köktürk, 1995; Chon & Woo, 1996; Aybal, 2001; Alp, 2005; Sarioğlu, 2005; Tepe, ve ark., 2005; Danabaş, 2009; Sentürk ve ark., 2010; Mihaly-Cozmuta, ve ark., 2014).

2.2.2. Zeolitlerin özellikleri

Bal peteğine benzer mikro gözenekli, tek düze bir yapıya sahiplerdir. Bu mikro gözeneklerin mikro pencerelerle birleşmesiyle bir, iki ya da üç boyutlu boşluk sistemleri oluşturulur. Yapay A ve X zeolitleri üç boyutlu sistemlere örnek verilebilir ve diğer bazı zeolitlerde ise boşluk sistemi kanallar şeklindedir (Yücel ve Çuflaz, 1984; Chon & Woo, 1996; Aybal, 2001; Alp, 2005; Sarioğlu, 2005; Tepe, ve ark., 2005; Danabaş, 2009; Sentürk ve ark., 2010; Mihaly-Cozmuta, ve ark., 2014).

Zeolitlerde pencere çapı 3-10 °A arasında değişir ve bu durum zeolitin ve içerdği katyonun türüne bağlıdır (Thomve ark., 2003). Zeolitlerin mikro gözenekleri sentez edildiğinde su ile doludur ve bu su ısıtıldığında buharlaşıp yapıdan uzaklaşır; ancak kristal yapının bozulmasına neden olmaz. Buharlaşan suyun kristal yapıda bıraktığı boşluklar, bu boşluklara sığabilecek büyüklükte olan gaz ve sıvı molekülleriyle doldurulabilir

(Yücel ve Çuflaz, 1984; Chon & Woo, 1996; Aybal, 2001; Alp, 2005; Sarioğlu, 2005; Tepe, ve ark., 2005; Danabaş, 2009; Sentürk ve ark., 2010; Mihaly-Cozmata, ve ark., 2014).

Zeolitler polar olan ya da polarize olabilen moleküllere daha çok ilgi gösterir. Bu özelliğin temelinde kristal yapısının anyonik niteliği ve elektrik yükünü dengeleyen katyonların sebep olduğu elektrostatik alan vardır. Zeolitlerde adsorbsiyon mekanizması bir yüzeye tutunma şeklinde değil de bir boşluğu doldurma biçiminde düşünülmelidir. Çünkü zeolit kristalinin dış yüzeyine tutunan molekül miktarı, kristal yapı içine giren ve boşlukları dolduran molekül miktarının %1'i kadardır. Dehidrate edilen zeolitin gözenekleri bir gaz ya da sıvı ile temas ettirildiğinde bu moleküller tarafından hızlıca doldurulur ve gözenekler tamamıyla dolduğunda adsorbsiyon olayı durur (Yücel ve Çuflaz, 1984; Chon & Woo, 1996; Aybal, 2001; Alp, 2005; Sarioğlu, 2005; Tepe, ve ark., 2005; Danabaş, 2009; Sentürk ve ark., 2010; Mihaly-Cozmata, ve ark., 2014).

2.2.2.1. Zeolitlerin iyon değiştirici özellikleri ve uygulama alanları

Zeolitler seçici olarak katyon değiştirebilme özellikleri sayesinde endüstride ve evlerdeki kullanım sularının sertliğini giderilmesi amacıyla kullanılırlar ve bu alanda yapılan çalışmalar aynı amaçla kullanımda olan organik iyon değiştirici reçinelere göre daha üstün olduklarını kanıtlamıştır. Ancak son zamanlarda çevre kirlenmesinin önüne geçmek için yapılan çalışmalarda zeolitlerin iyon değiştirme özelliklerinden faydalanılarak çeşitli uygulamalar geliştirilmiştir. Deterjanlarda fosfatlar yerine iyon değiştiricisi olarak zeolitlerin kullanılabileceği belirtilmiştir. Zeolitler yem katkı maddesi yapımında da kullanılırlar. Amonyak iyonuna karşı seçiciliği olan zeolit, azotun sindirim sisteminde daha verimli olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Bu alanda yapay zeolit A ve X üstün özelliğe sahip olan zeolitlerdir.

Küba da yapılan çalışmalarda, doğal zeolitlerin mide ülseri tedavisinde ve mide asiditesinin azaltılmasında etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca zeolit tozunun eksternal olarak kullanımının cerrahi insizyonlarının ve yaraların iyileşme süresini önemli ölçüde kısalttığı ifade edilmiştir (Mumpton, 1999).

2.2.3. Zeolit türleri

Suyu uçurulan zeolitlerin küçük organik molekülleri absorbe ettikleri büyük molekülleri reddettikleri gözlenmiştir. Bu sebeple McBain tarafından ‘molekül eleği’ olarak tanımlanmıştır. 1950 yılına kadar Japonya’da Sameshima, İngiltere’de Barrer laboratuvarlarında zeolitlerin iyon değiştirme, suyunun uçurulması ve adsorbsiyon özelliklerine ait çalışmalar yapılmıştır. Endüstriyel alanda kullanımları için doğal zeolitlerin yeterli miktarda üretimleri o yıllarda mümkün olmamıştır. Bu sebeple yapay üretime yönelim olmuştur. İngiltere’de ve ABD’de yapay üretim için deneylere başlanılmış ve doğada henüz bulunmayan ve üstün eleme özelliğine sahip olan bir zeolit türü üretilmiştir. Zeolit A olarak adlandırılan bu yapay zeolit günümüzde en fazla üretilen zeolittir. Laboratuvar çalışmalarının devam etmesiyle X ve Y kristalleri de üretilmiş ve Zeolit A ile beraber üretimleri en çok olan zeolitler olarak piyasada yerlerini almışlardır. Zeolitlerin doğal ve yapay formlarının gözenek boyutları ve Mol oranları Tablo 2-5’de gösterilmiştir (Yücel ve Çuflaz, 1984; Çınar, 2005).

Tablo 2-5: Zeolit türleri (Yücel ve Çuflaz, 1984; Çınar, 2005).

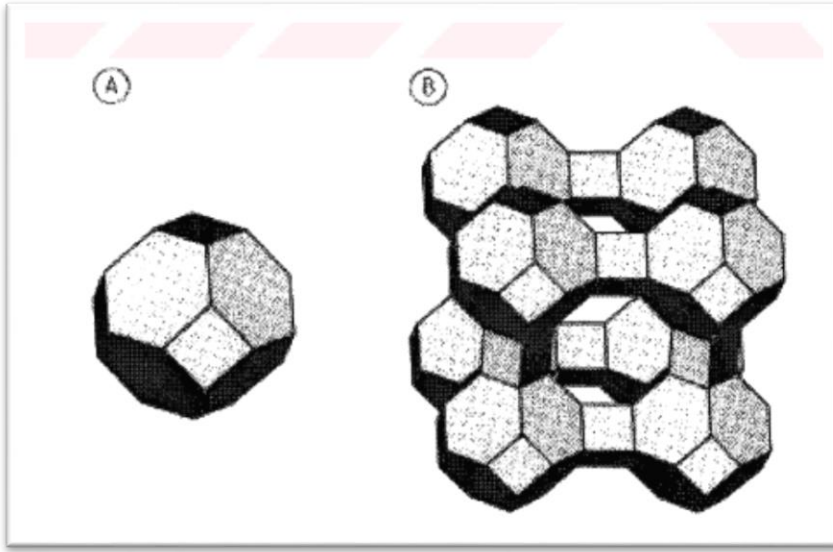
Zeolit türü	Gözenek boyutları	Mol oranı SiO₂/Al₂O₃
<i>Doğal zeolitler</i>		
Mordenit	6,7x7,0	8,2-10
Çabazit	3,6x3,7	3,2-6
Erionit	3,6x5,2	5,8-7,4
Klinoptiolit	(4,4x7,2), (4,1x4,7)	8,5-10,5
<i>Yapay zeolitler</i>		
KA	3	2,0
NaA	4	2,0
CaA	5	2,0
X	7,4	2,0-3,0
Y	7,4	2,0-3,0

Yapay zeolit üretim yerleri kullanılan hammadde kaynaklarına bağlı olarak iki grupta toplanabilir.

1. Doğal minerallerin hammadde olarak kullanılması: Doğal zeolit yapısındaki alüminyum boksitten faydanılması ya da yapay zeolit üretiminde kil minerallerinin kostik soda ile kullanımı ile zeolite dönüştürülmesi gibi yöntemlerle elde edilebilir.
2. Hidrojelden üretim: Sodyum silikat çöktürülmüş amorf silika tozu, kostik soda ile hazırlanan sodyum alüminat peltesi ve alüminyum trihidrat gibi yüksek saflıkta hammaddeler kullanılır.

Elde edilen üretimlerde zeolit sodyum katyonunu içerir. İnce toz görünümünde ürün elde edilir; 0,5-5 µm boyutlarındadır.

Zeolitler her alüminosilikat yapıda olduğu gibi poröz kristaller olarak tanımlanabilir. Yapısı SiO_4 ya da AlO_4 dört yüzlülerinin oksijen iyonunu paylaşarak diğer SiO_4 ya da AlO_4 ile çok uzun bir üç boyutlu ağ yapısını meydana getirir. Aynı zamanda bu zincir de oksijen iyonunun paylaşılması ile SiO_2 meydana getirilir (Yücel ve Çuflaz, 1984). Dört yüzlülerin uzayda değişik biçimde birleşimlerinden zeolit bir bal peteğine benzer gözenek ve kristal yapısı oluşur (Şekil 2-13). Silisyum iyonunun yerinde alüminyum iyonunun bulunduğu dört yüzlülerin elektrik yükünün dengelenmesi ve kararlı bir kristal yapı için ek bir artı yüke ihtiyaç vardır. Bu ek artı yük değiştirilebilir kationlarca sağlanır. Bazı zeolitlerin yapıları dört yüzlülerin oluşturduğu çok yüzlüler tarafından daha iyi tanımlanabilir. Bu çok yüzlülerin en önemlilerinden biri kesik kübik sekizyüzlülerinden oluşan yapay A ve X zeolitlerinin kristal yapılarıdır (Yücel ve Çuflaz, 1984; Chon & Woo, 1996; Aybal, 2001; Alp, 2005; Sarıoğlu, 2005; Tepe, ve ark., 2005; Danabaş, 2009; Sentürk ve ark., 2010; Mihaly-Cozmuta, ve ark., 2014).



Şekil 2-13: Zeolit a) Solid yapı b) İskeletsel yapı

Zeolitlerin gözenek boyutları kristal yapılarına ve bir dereceye kadar da içerdikleri katyonlara bağlıdır. Çoğu zeolitte kristal yapı Si-O-Al atomlarının meydana getirdiği halkalarla bağlanmış gözeneklerden oluşur. Bu halkaların oluşturduğu geçit pencere olarak adlandırılır ve pencere boyutu halkalardaki atom sayıları ile orantılıdır. Pencere 4-12 arası oksijen iyonu (ve eşit sayıda alüminyum ya da silisyum) içerir (Yücel ve Çuflaz, 1984).

2.2.3.1. Zeolitin yapısında yer alan katyonların önemi

Zeolitlerin kristal yapılarında yer alan her AlO_4 dörtyüzlüsü yapıya negatif bir yük getirerek bu yükün katyonlar tarafından dengelenmesini sağlamalıdır.

Katyonlar;

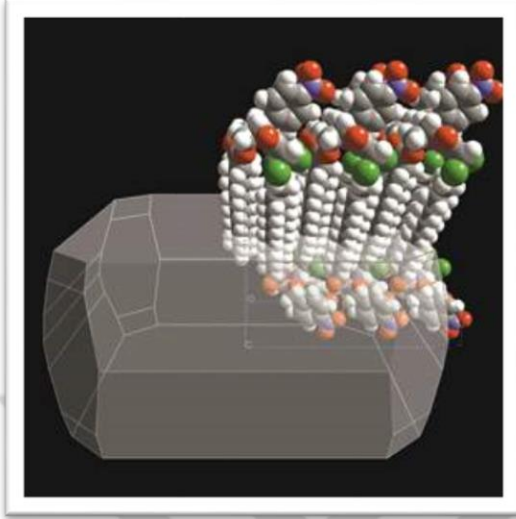
- 1) Zeolitlerin gözeneklerinde yer alan katyonlar başka iyonları içeren çözeltilerle temasa geçtiklerinde bu iyonlarla yer değiştirebilme potansiyeline sahiptir. Bu yöntem sayesinde zeolitin çeşitli katyonlar içeren türlerinin hazırlanabildiği bildirilmiştir.

- 2) Sulu ortamda hareket halinde olan katyonlar, zeolitlerde mevcut olan su ısıtılarak uçurulduğunda zeolitin kanal ve gözeneklerinde belirli yerleri seçer ve stabil duruma geçebilir. Katyonlar tarafından seçilen bu yerler zeolitin penceresine yakın olduğunda zeolitin pencere boyutu daraltılmış olur. Böylece katyon değiştirilerek bir zeolitin etkin pencere boyutu ile oynanılabilir. Zeolit A, sekiz oksijen iyonu içeren, çapı ortalama 5°A olan pencerelerle birleşen üç boyutlu bir gözenek sistemidir. Ancak zeolit A'da sodyum katyonları olduğunda bu katyonların bazıları pencere yakınlarında yer alarak pencereleri uygun ölçüde kapatıp etkin olan pencere boyutunu 4°A 'a düşürürler. Eğer sodyum iyonları potasyum iyonları ile yer değiştirecek olursa bu iyonlar sodyumdan daha büyük olduklarından etkin olan pencere çapı daha da küçültülerek 3°A düşer. Eğer bu katyonlar yerlerini kalsiyum iyonlarına bırakırsa bir kalsiyum iyonu değerlik olarak iki sodyum ya da potasyum iyonuna eş olduğundan pencere önünde bulunan katyonlar çekilerek pencere etkin çapını 5°A 'a çıkarırlar. Böylece katyon değişimiyle aynı zeolitin değişik pencere boyutlarında çeşitli türleri hazırlanmış olur.
- 3) Zeolit gözeneklerinde mevcut katyonların sayısı, türü ve yerleri gözenek içindeki elektrik yük dağılımını etkiler. Bu sebeple katyon değişimi yoluyla zeolitin adsorbsiyon özellikleri değişebilir (Yücel ve Çuflaz, 1984; Chon & Woo, 1996; Aybal, 2001; Alp, 2005; Sarioğlu, 2005; Tepe, ve ark., 2005; Danabaş, 2009; Sentürk ve ark., 2010; Mihaly-Cozmata, ve ark., 2014).

2.2.3.2. Zeolitlerde $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ oranının önemi

Bazı zeolitlerde AlO_4 dörtyüzlüleri SiO_4 ile yer değiştirilebilir ve bu durum kristal yapıda bir değişikliğe neden olmaz ve belirli sınırlar içinde bu oran değiştirilebilir. Zeolit A ve zeolit X de $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ oranı yaklaşık olarak ikidir ve bu oran zeolitlerin ulaşabileceği en yüksek Al miktarıdır. Löwenstein kuralı uyarınca bir oksijen iyonu iki alüminyum iyonuna bağlanamaz, Al-O-Al bağları oluşturulamaz. Bu durumda zeolit A ve X en yüksek katyon kapasitesi olan ve en heterojen iç yüzeyi olan maddelerdir. Alüminyum açısından zengin olan zeolitlerin genellikle ısıya ve aside karşı dayanıklılıkları azdır. Bunun sebebi ise dörtyüzlülerde bulunan alüminyumun ısıya ve aside karşı direncinin zayıf olmasıdır. $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ oranı arttıkça zeolitlerin aside ve

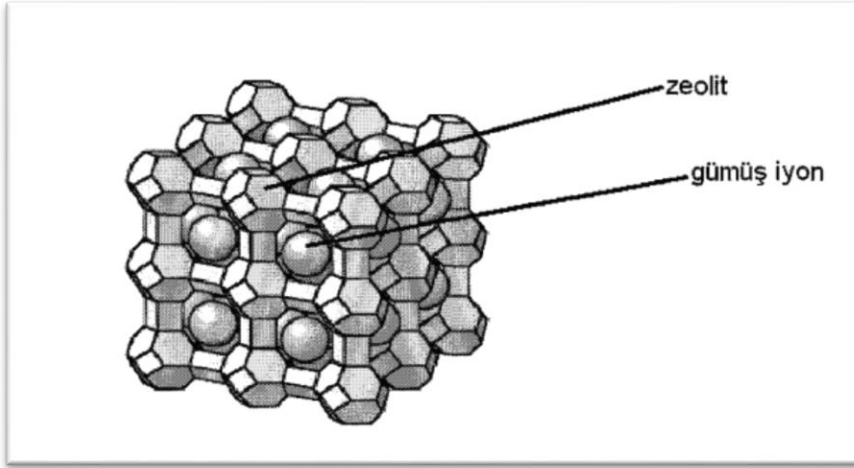
sıcağa karşı dayanıklılıklarının arttığı bildirilmiştir (Yücel ve Çuflaz, 1984). Zeolit içindeki anyon ve katyonların şematik görünümü Şekil 2-14’de gösterilmiştir.



Şekil 2-14: Zeolit içindeki anyon ve katyonların şematik görünümü.

2.2.3.3. Gümüş zeolit

Diş hekimliğinde, en yüksek iyon değişirme potansiyeli olan zeolit A kullanılmaktadır. Zeolitın gümüş iyonuna karşı ilgisi oldukça yüksektir. Kendi ağırlığının %40’ından daha fazla gümüş iyonunu elektrostatik olarak yapısına bağlayabilir (Şekil 2-15). Zeolit A bir taşıyıcı olarak kullanılır; zeolitın boşluklarında bir antimikrobiyal olan gümüş gibi katyonlar varsa çevre dokularda antimikrobiyal bir etki sağlanabilir (Kim ve ark., 1998; Morishita ve ark., 1998; Mumpton, 1999; Kawahara ve ark., 2000).



Şekil 2-15: Zeolitin kanalcıklı yapısına gümüş iyonlarının yerleşmesi

Gümüş ile zeolitin birbirine bağlanması iyon değişimi prensibi ile olur. Zeolitler gümüş iyonunun sürekli salınımını, moleküler yapısına yüklenmiş olan iyonları çevresindeki iyonlarla değiştirerek sağlarlar ve doku hücrelerinde herhangi bir zararlı etki yaratmaksızın uzun süre antimikrobiyal etki göstermesi söz konusu olur (Breck, 1984; Matsuura ve ark.,1997; Hotta ve ark., 1998; Morishita ve ark., 1998; Ueshige ve ark.,1999;Kawahara ve ark., 2000; Abe ve ark., 2003).

Gümüş zeolitin bakterisid özelliği için iki farklı mekanizma olduğu bildirilmiştir. Birincisinde zeolitten salınan gümüş iyonları doğrudan bakterisid etki gösterir. Diğerinde ise matriks için mevcut olan gümüşün oksijeni aktive etmesiyle üretilen reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu bakterisid etkidir. Gümüş zeolitin antibakteriyel etkinliği için oksijenin gerekli olduğu bazı araştırmacılar tarafından kabul edilirken (Matsuura ve ark.,1997), diğer araştırmacılar anaerobik ortamlarda da oral bakterilere karşı antibakteriyel etkinliğin olduğunu ifade etmişlerdir (Patel ve ark., 2000; Wilder ve ark., 2000; Chung ve ark., 2001).

2.2.4. Zeolitin Kullanım Alanları

Dünya’da zeolit üretiminin büyük bir kısmı Küba tarafından karşılanmaktadır. Diğer önemli üreticiler ABD, Japonya, İtalya, Macaristan, Bulgaristan’dır. Dünya’da yılda ortalama zeolit üretimi 750 000 tondur. Bu üretimin %70’i deterjanlarda, %10’u katalizör

olarak, %8 nem çekici olarak, %12 ise bunların dışındaki alanlarda kullanılmaktadır (Köktürk, 1995).

Kirlilik kontrolünde, enerji üretiminde, madencilik ve metalürji, tarım ve hayvancılık alanında oldukça yaygın kullanımı görülmektedir. Zeolitlerin iyon değişimi ve adsorban özellikleri sayesinde kirlilik kontrolünde kullanımları mevcuttur. Atık sulardaki metal iyonlarının tutulmasında, baca gazlarının emilmesinde, sulardaki radyoaktif atıkların temizlenmesinde, çöplerin depolanmasında kullanımları sözkonusudur (Gülen ve ark., 2012; Yücel ve Çuflaz, 1984; Chon & Woo, 1996; Aybal, 2001; Alp, 2005; Sarıoğlu, 2005; Tepe, ve ark., 2005; Danabaş, 2009; Sentürk ve ark., 2010; Mihaly-Cozmuta, ve ark., 2014).

Dünyanın büyüyen enerji ihtiyacı; kömür ile petrol yanında nükleer ve güneş enerjisi gibi kaynaklardan karşılanmaya çalışılmaktadır. Bu kaynakların enerjiye dönüştürülmesi sırasında doğal ve yapay zeolitlerden faydalanılmaktadır. Doğal zeolitler toprak hazırlanmasında ve gübrelemede taşıyıcı olarak, tarımsal alanda ilaç taşıyıcısı olarak oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca hayvan yemi olarak besicilikte katkı maddesi amacıyla kullanılmaktadır. Zeolitler metalurjide ağır metallerin tutulmasında ve maden yataklarının aranmasında kullanılmaktadır. Ayrıca, zeolitlerin kağıt sektöründe, inşaat sektöründe, sağlık sektöründe, deterjan sektöründe de oldukça yaygın kullanımları mevcuttur (Gülen ve ark., 2012; Yücel ve Çuflaz, 1984; Chon & Woo, 1996; Aybal, 2001; Alp, 2005; Sarıoğlu, 2005; Tepe, ve ark., 2005; Danabaş, 2009; Sentürk ve ark., 2010; Mihaly-Cozmuta, ve ark., 2014).

Zeolitler, iyon değiştirme kapasitesi, absorpsiyon özellikleri, kanalsı yapılarına bağlı elek özellikleri, silis ve aliminyum bileşenler ve renkleri ile endüstride geniş kullanım alanı bulmaktadır (Yücel ve Çuflaz, 1984; Chon & Woo, 1996; Aybal, 2001; Alp, 2005; Sarıoğlu, 2005; Tepe, ve ark., 2005; Danabaş, 2009; Sentürk ve ark., 2010; Mihaly-Cozmuta, ve ark., 2014).

Çernobil kazasında radyoaktif atıkların temizlenmesi zeolitin bir türü olan klinoptilolit ile yapılmıştır. Santralin üstü mordenit ve klinoptilolit ile kaplanarak sızıntı

önlenmiştir. Sr90, Cs137, Co60, Ca45 türü radyoizotoplar zeolitler sayesinde tutulmaktadır (Pavelic, 2003).

Atık suların temizlenmesinde; şehir ve endüstri atıklarının tutulmasında, toprakların ağır metalle kirlenmesinde (kurşun, civa v.s), kapalı göllerde azot ve metan artışına bağlı oluşan ölümlerin engellenmesinde kullanılmaktadır. Hayvan gübrelerinden amonyumun uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır (Haidouti, 1997). Klinoptilolit canlı *Salmonella typhimurium* sayısının toprakta ve suda da azalmasını sağlar (Pavelic, 2003).

Zeolit türleri ayrıca bitkisel ve hayvansal üretim, kirlilik kontrolü, yolların buzlanmasının önlenmesi, meyve ve sebzelerin depolanması ile nakli ve akuakültür gibi bir dizi alanda kullanılmaktadırlar (Aybal, 2001).

Zeolit birçok farklı alanda kullanım imkanı bulmuştur. Tıp ve dişhekimliği alanında son yıllarda kullanımı artmış ve bu alanda araştırmalar hızlanmıştır. Son yıllarda özellikle gümüş ile desteklenmiş zeolitik yapıların antibakteriyel etkisi nedeniyle, diş hekimliğinde kanal dolum maddeleri içinde, protezlerde akriliğin direncini arttırmak amacıyla kullanılması üzerine çalışmalar mevcuttur. Antimikotik özelliğinden faydalanılarak protez altındaki astar maddesi içerisinde ve gargaraların içeriğinde kullanımı söz konusudur (Kawahara ve ark. 2000; Casemirove ark. 2008; Cinar ve ark. 2009).

Biz de zeolitin antimikotik özelliğinden yola çıkarak oral *Candidalara* direnç geliştiren ilaçlara alternatif olarak zeolit kullanımının yaygınlaştırılabileceğini hedef olarak bu çalışmayı gerçekleştirdik.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalı laboratuvarında protez stomatitli hastaların sürüntü örneklerinden izole edilen 114 *Candida* suşu kullanılmıştır. Klinik örneklerden izole edilen suşların tür düzeyinde tanımlaması API ID 32 C identifikasyon sistemi kullanılarak yapılmıştır. API ID 32 C kiti her biri farklı, dehidrate karbonhidrat substratı içeren 32 kuyucuktan oluşan, kuyucuklarda mayaların karbonhidrat kullanım özelliklerini belirleyen bir maya tanımlama sistemidir. Protez stomatitli hastalardan izole edilen suşların dağılımı tür düzeyinde Tablo 3-1 de gösterilmiştir. Çalışmamızda kalite kontrol amacı ile *C. parapsilosis* ATCC 22019 ve *C. krusei* ATCC 6258 suşları kullanılmıştır.

Çalışmanın tüm aşamaları İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3-1: Protez stomatitli hastalardan izole edilen suşların dağılımı.

İzole edilen suşlar	Sayı (%)
<i>C. albicans</i>	65 (%57)
<i>C. glabrata</i>	34 (%29,9)
<i>C. tropicalis</i>	6 (%5,2)
<i>C. parapsilosis</i>	3 (%2,6)
<i>C. kefyr</i>	3 (%2,6)
<i>C. guilliermondii</i>	2 (%1,8)
<i>C. krusei</i>	1 (%0,9)
Toplam	114

3.1. Kullanılan besiyerlerinin, zeolitın ve resazurinin hazırlanması

3.1.1. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) besiyeri hazırlanışı

Sabouraud tarafından tanımlanan dekstroz agarın modifiye edilmiş şeklidir. Mayaların ekimi için kullanılır. Yüksek dekstroz konsantrasyonu ve asidik pH mantarların selektivitesine olanak sağlamaktadır. Asidik pH (5-6) mantarların gelişimini kolaylaştırırken, bakterilerin gelişimini azaltmaktadır.

SDA hazırlanışı

Kazeinin pankreatik dijesti (5.0 g),

Hayvan dokularının peptik dijesti (5.0 g),

Dekstroz (40.0 g),

Agar (15.0 g),

1000 ml distile

Maddeler tartılarak distile su içine ilave edilir ve 121 °C’de 15 dakika otoklavda sterilizasyon işlemi gerçekleştirilir. Hazırlanan besiyeri 50 °C’ye soğutulduktan sonra Petri kutularına 20’şer ml olacak şekilde dağıtılır (Şekil 3-1).



Şekil 3-1 : Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) besiyeri

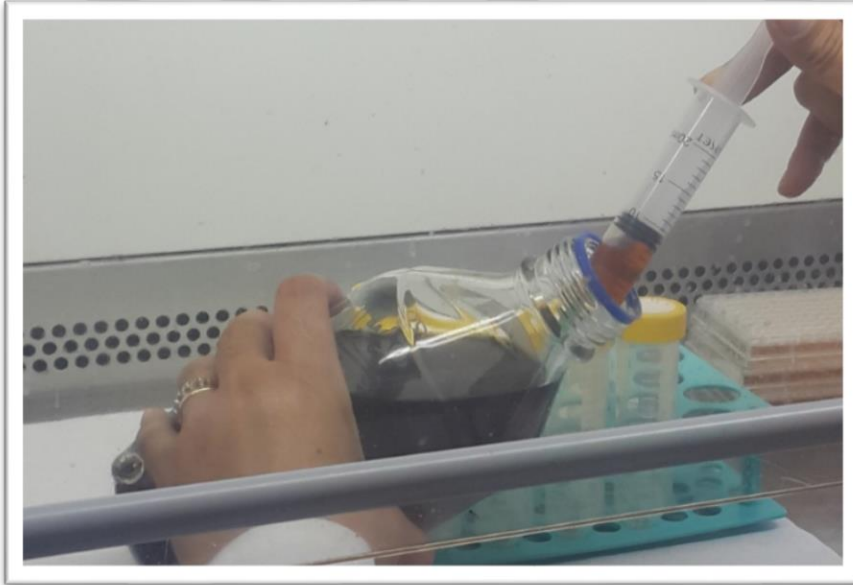
3.1.2. RPMI 1640 Besiyeri hazırlanışı

Roswell Park Memorial Institute, RPMI 1640 kısaltılmış adıyla bilinen, antifungal mikrodilüsyon yönteminde kullanılan standart bir besiyeridir.

RPMI 1640 hazırlanışı

RPMI 1640 toz (Bikarbonatsız, glutaminli, fenol kırmızılı)	10,4 gr
MOPS (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid)	34,53gr
Distile su	900 ml

Maddeler tartılarak distile su içinde çözündürülür. Besiyerinin pH'ı 7.0 olarak ayarlanır ve son hacminin 1000 ml olması için besiyerine distile su eklenir. RPMI 1640 besiyeri yüksek ısıya duyarlı olduğu için 0,2µm por çaplı enjektör filtresiyle filtrasyon yöntemi ile steril edilir (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: RPMI 1640 Besiyeri

3.1.3. Antifungal maddelerin hazırlanışı

Mayaların antifungal duyarlılık deneylerinde flukonazol için kullanılacak mikrodilüsyon konsantrasyon aralığı 64-0,125 µg/ml ve itrakonazol için kullanılacak mikrodilüsyon konsantrasyon aralığı 16-0,0313 µg/ml olarak bildirilmiştir (CLSI M27-A3 ve CLSI M27-S3, Wayne, 2008; CLSI M27-S4, Wayne, 2012). Mikrodilüsyon yönteminde, hedeflenen başlangıç konsantrasyonunun 2 katı dilüsyonunda olacak şekilde antifungal madde solüsyonu hazırlanmalıdır. Hazırlanacak konsantrasyondaki madde miktarının çok küçük olması tartımda zorluklar yaşanmasına neden olacağı için hedef miktarının en az 10-100 katı olacak şekilde antifungal maddelerin çözücünde stok konsantrasyonu hazırlanmalı ve RPMI 1640 besiyeri kullanılarak uygun sulandırım ile hedef konsantrasyon elde edilmelidir.

Flukonazol

Konsantrasyon aralığı	64-0,125 µg/ml
Başlangıç konsantrasyonu	64 µg/ml
Hedeflenen konsantrasyon	256 µg/ml
Tartılacak toz madde miktarı	2560 µg
Distile su/ Dimetil sülfoksit (DMSO)	1 ml

Tartılan toz madde distile su içinde çözündürülür ve 0,2 µm por çaplı enjektör filtresinden geçirilerek steril edilir. Hazırlanan solüsyon RPMI 1640 besiyeri kullanılarak 1:10 oranında sulandırılır ve hedeflenen konsantrasyon (256 µg/ml) elde edilir.

İtrakonazol

Konsantrasyon aralığı	16-0,0313 µg/ml
Başlangıç konsantrasyonu	16 µg/ml
Hedeflenen konsantrasyon	64 µg/ml
Tartılacak toz madde miktarı	6400 µg
DMSO	1 ml

Tartılan toz madde DMSO içinde çözündürülür ve 0,2 µm por çaplı enjektör filtresinden geçirilerek steril edilir. Hazırlanan solüsyon RPMI 1640 besiyeri kullanılarak 1:100 oranında sulandırılır ve hedeflenen konsantrasyon (64 µg/ml) elde edilir.

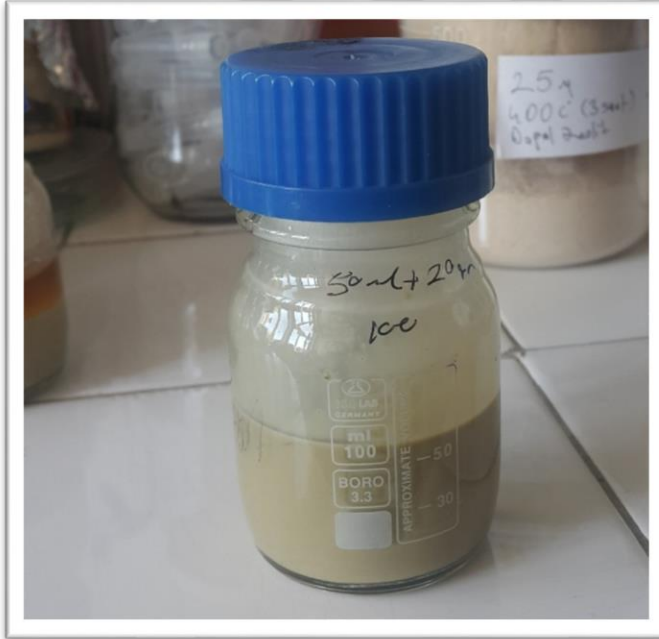
3.1.4. Zeolit süspansiyonunun hazırlanması

Zeolitler alkali ve toprak alkali elementlerin kristal yapısına sahip sulu alüminosilikatlardır. Doğal zeolitlerin doğada bulunup işlenmesi diğer minerallere göre daha kolay ve ucuz olduğu bilinmektedir. Zeolitin kafese benzeyen yapısında gözlenen kanallarda alkali katyonlar ve çok sayıda su molekülü mevcuttur. Zeolitlerin mikro gözenekleri sentez edildiğinde su ile doludur ve bu su ısıtıldığında buharlaşıp yapıdan uzaklaşır; ancak kristal yapının bozulmasına neden olmaz. Buharlaştıran suyun kristal yapıda bıraktığı boşluklar, bu boşluklara sığabilecek büyüklükte olan gaz ve sıvı molekülleriyle doldurulabilir.

Çalışmamızda zeolitin boşluklu yapısının fazla olması nedeniyle ısıtılarak suyunun buharlaştırılması, böylece birim hacimdeki etken madde miktarının arttırılması hedeflenmiş, bu şekilde hazırlanan zeolitin antifungal etkinliğinin de artabileceği düşünülmüştür. Bu amaç ile 25µm çapında taneciklere sahip doğal zeolit 100°C, 200°C ve 400 °C'ye kadar 3 farklı ısıda 3 saat süreyle ısıtılarak suyu uçurulmuş 3 farklı formu kullanılmıştır. Elde edilen ürünler kullanım öncesinde otoklavda 121°C'de 15dk steril edilmiştir (Şekil 3-3). Zeolitin 3 farklı formdaki tozlarının RPMI 1640 besiyerinde aseptik koşullarda başlangıç konsantrasyonu 400.000 µg/ml olacak şekilde süspansiyonları hazırlanmıştır (Şekil 3-4 ve Şekil 3-5).



Şekil 3-3: Farklı sıcaklık derecelerindeki doğal zeolitın otoklav işlemi sonrası görünümü



Şekil 3-4: Hazırlanan zeolit süspansiyonu



Şekil 3-5: Hazırlanan süspansiyonun bekletilmesi sonrasında zeolit'in dibe çökmesi

3.1.5. Resazurin (alamar blue, alamar mavisi)

Resazurin, alamar mavisinin aktif bileşeni olup hücre zarından geçebilen, toksik olmayan, hücrelerin canlılığını etkilemeyen, mavi renkli ve floresan özellik göstermeyen bir maddedir. Resazurin hücre içine girdikten sonra kuvvetli kırmızı floresan veren resofurine indirgenir. Mikroplaklar içinde var olan mikroorganizmalar üzerine resazurin eklenir ve 37°C'de 4 saat inkübe edilir. Mikroplak kuyucuğunda canlı hücre var ise renk değişikliği meydana gelir ve ardından meydana gelen renk değişikliği gözle ya da spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu yöntemde renk değişiklikleri hem florometrik olarak hem de spektrofotometrik olarak tespit edilir. Ayrıca bu boya toksik olmadığı için hücre canlılığının değerlendirilmesine olanak sağlar. Mikroorganizmalar üreyebiliyorsa yani canlı ise mavi renk pembeye dönüşür. Çalışmamızda resazurinin % 0,02'lik solüsyonu kullanılmıştır (Martin ve Palamino, 2012; Chadha ve Kale, 2015)

3.2. Antifungal Duyarlılık Deneyi

Maya süspansiyonlarının hazırlanması amacıyla her bir *Candida* suşunun SDA besiyerine ekimi yapılmış ve 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Üremiş olan kültürden öze /iğne yardımı ile saf kültür alınmış ve içinde 5 ml %0,85’lik steril tuzlu su içeren deney tüpünde süspanse edilmiştir. Hazırlanan süspansiyonların bulanıklığı aseptik koşullarda McFarland 0.5 olacak şekilde ayarlanmıştır (Şekil 3-6, Şekil 3-7 ve Şekil 3-8).

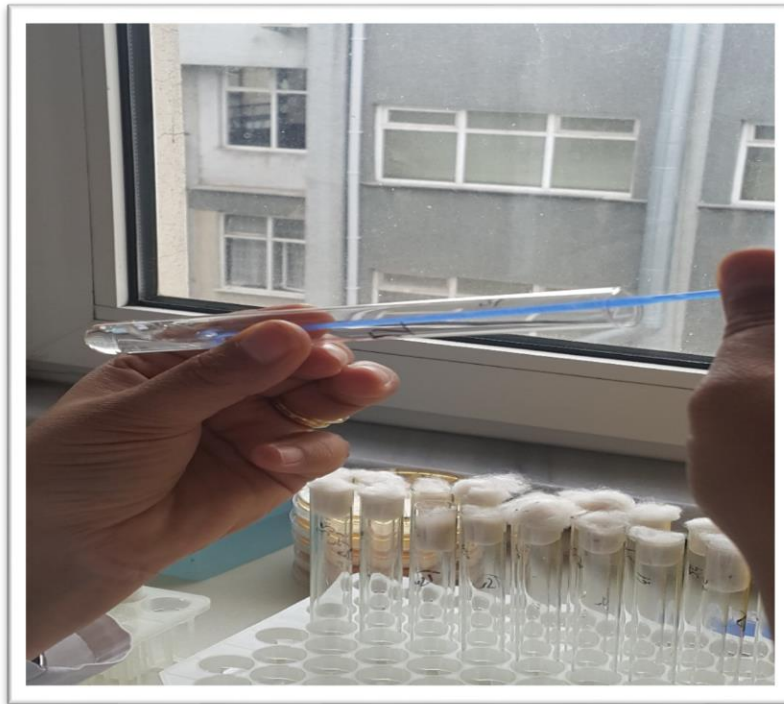
Önceden hazırlanmış ve sterilite kontrolü yapılmış RPMI 1640 besiyeri 96 kuyucuklu U tabanlı mikrolakların her kuyucuğuna 100’er µl olarak 12 ya da 8 kanallı otomatik pipet aracılığı ile dağıtılmıştır (Şekil 3-9 ve Şekil 3-10).

Flukonazol ve itrakonazolün deneyde kullanılacak başlangıç konsantrasyonunun en az 10/100 katı olacak şekilde çözücü içinde (steril distile su/DMSO) stok çözeltisi hazırlanır. Bölüm 3.1.3 de anlatıldığı şekilde RPMI besiyeri ile flukonazol ve itrakonazolün alt dilüsyonları hazırlanarak mikroplağın ilk sütununa 100’er µl olacak şekilde dağıtılmış ve 8 kanallı otomatik pipet ile 1-10 numaralı kuyucuklar arasında seri dilüsyon uygulanmış, 10 numaralı kuyucuktan sonra 100µl’lik hacim dışarı atılmıştır (Şekil 3-10). Onbirinci kuyucuk üreme kontrolü için (pozitif kontrol), 12. kuyucuk ise besiyeri sterilite kontrolü (negatif kontrol) için hazırlanmıştır.

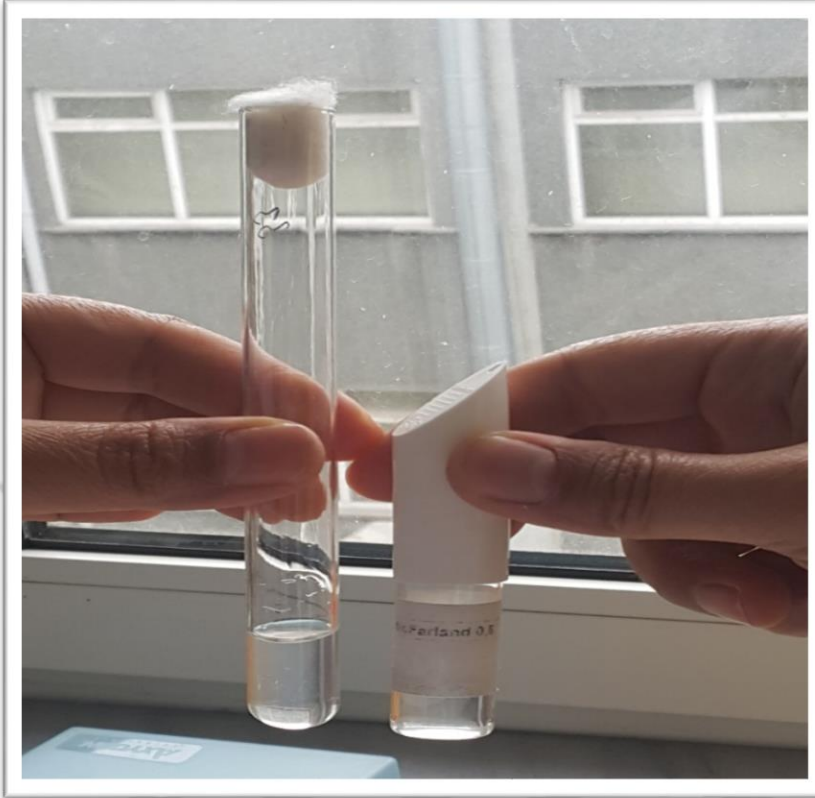
McFarland 0.5 olacak şekilde hazırlanan maya süspansiyonu ilk önce 1/50 ve daha sonra dilüe edilmiş süspansiyon 1/20 oranında tekrar dilüe edilerek son konsantrasyonun $1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$ CFU/ml olması sağlanmıştır (Şekil 3-11). Dilüe edilen maya süspansiyonu 12 numaralı sütunda bulunan kuyucuklar hariç (negatif kontrol) tüm kuyucuklara 100’er µl olarak eklenmiştir (Şekil 3-12). Mikrolaklar 35°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 11 numaralı sütunun kuyucuklarındaki (pozitif kontrol) üreme temel alınarak, pozitif kontrol kuyucuğundaki üremenin %50 oranında azaldığının gözlendiği kuyucuktaki konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir.



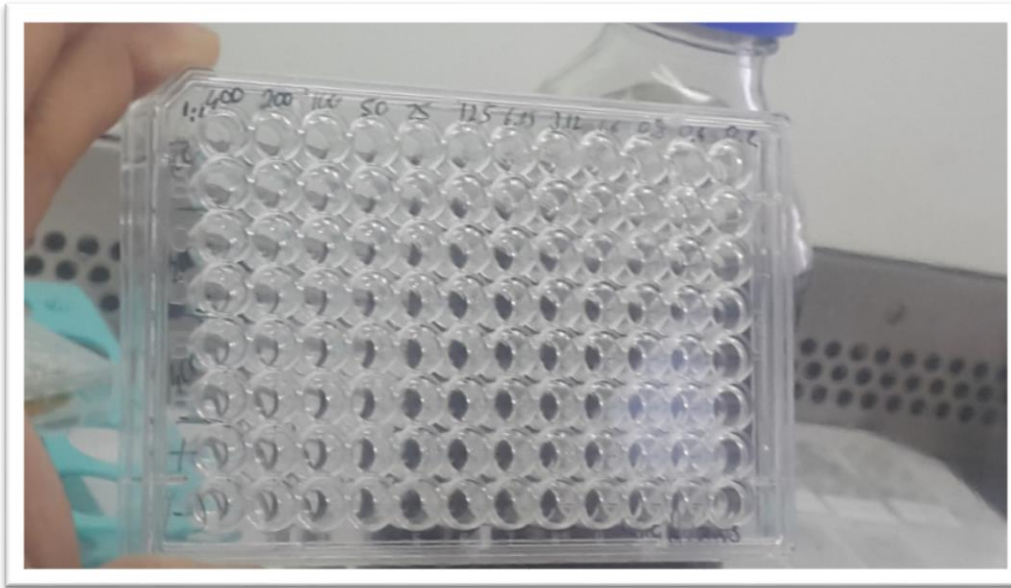
Şekil 3-6: Sabouraud Dekstroz Agar besiyerine ekimleri yapılmış *Candida* kökenleri



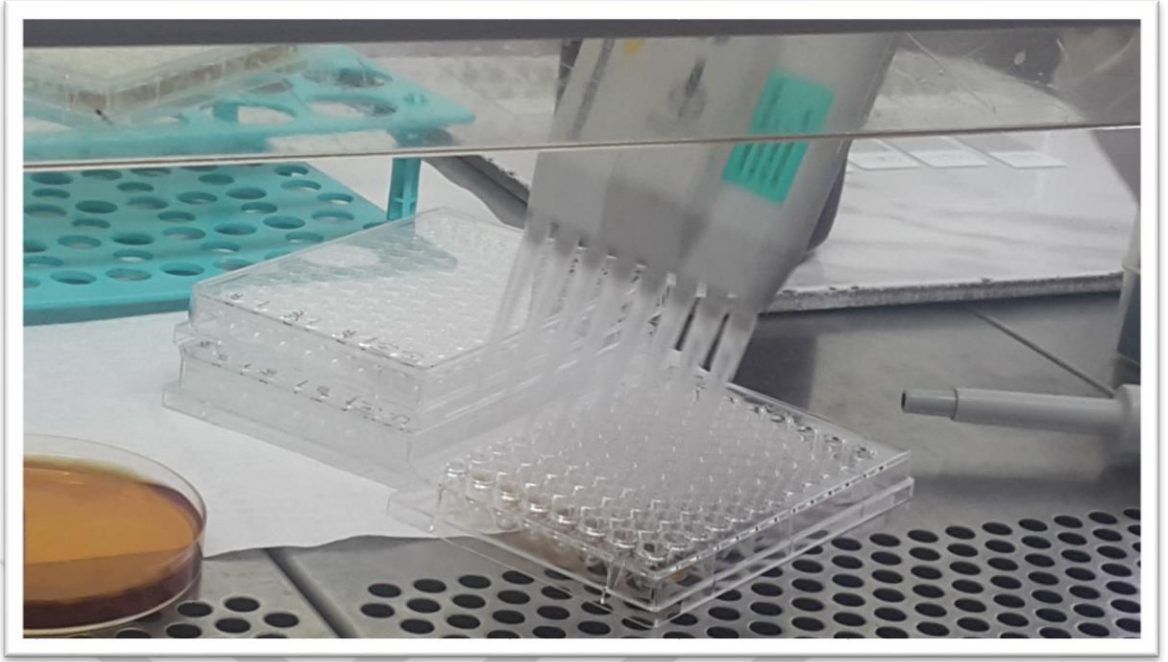
Şekil 3-7: Tuzlu suda (%0,85'lik) *Candida* süspansiyonu hazırlanması



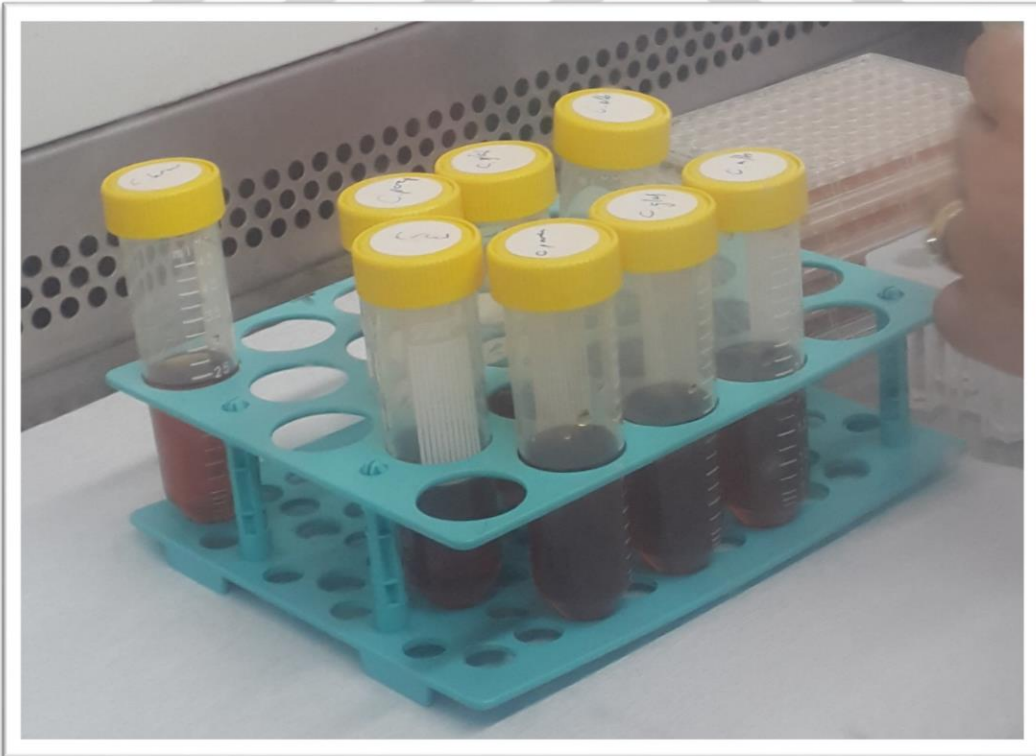
Şekil 3-8: McFarland 0.5'e göre süspansiyonun bulanıklık ayarı



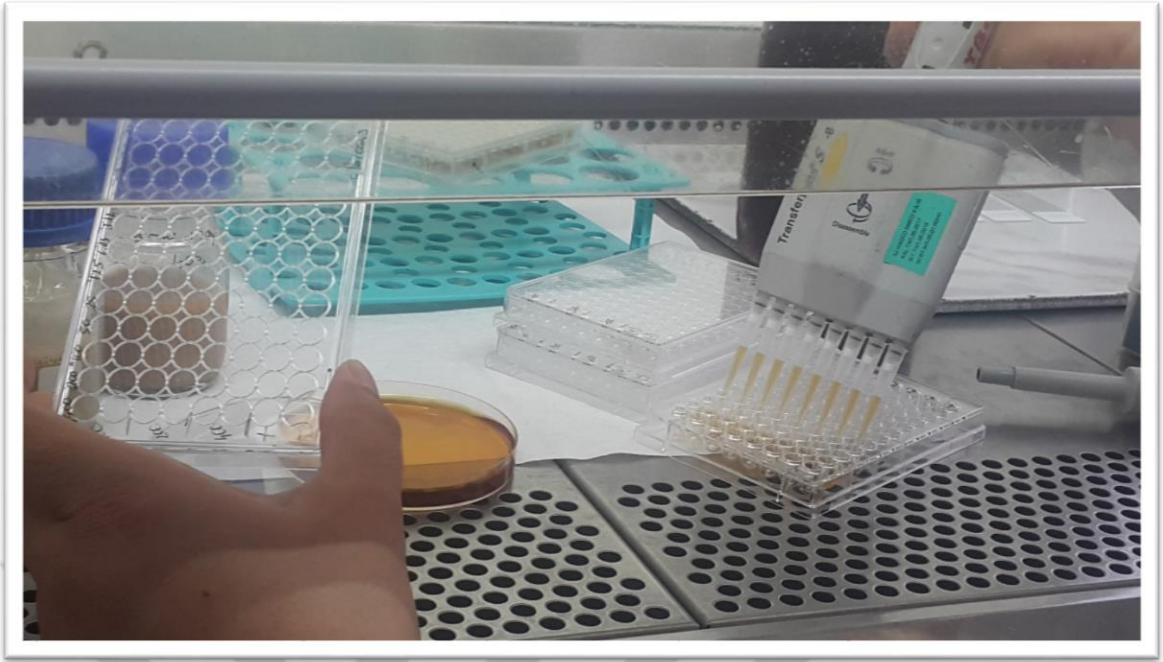
Şekil 3-9: 96 kuyucuklu U tabanlı mikrodilüsyon plağı



Şekil 3-10: Otomatik pipet ile mikrolakların doldurulması



Şekil 3-11: RPMI 1640 besiyerinde dilüe edilmiş *Candida* suşları (1/50 ve daha sonra 1/20)



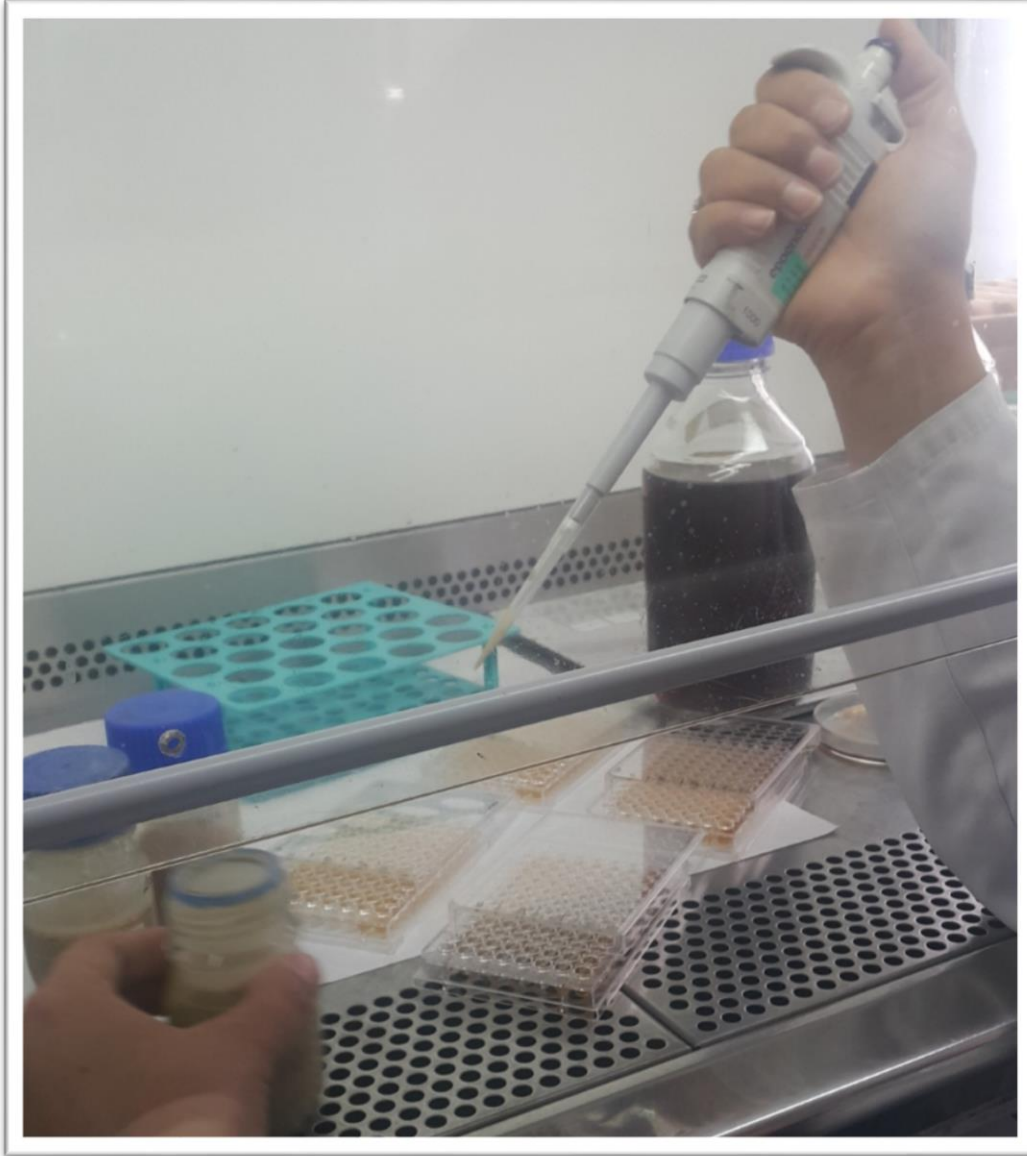
Şekil 3-12: RPMI 1640 besiyerinde dilüe edilmiş *Candida* suşlarının mikropklara aktarılması

Deneylerin ikinci aşamasında zeolitin antifungal etkinliğini değerlendirmek için aynı suşlar kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır. Zeolitin 3 farklı formdaki tozlarının RPMI 1640 besiyerinde aseptik koşullarda 200.000µg/ml-98µg/ml’lik son konsantrasyon aralığı kullanılmıştır.

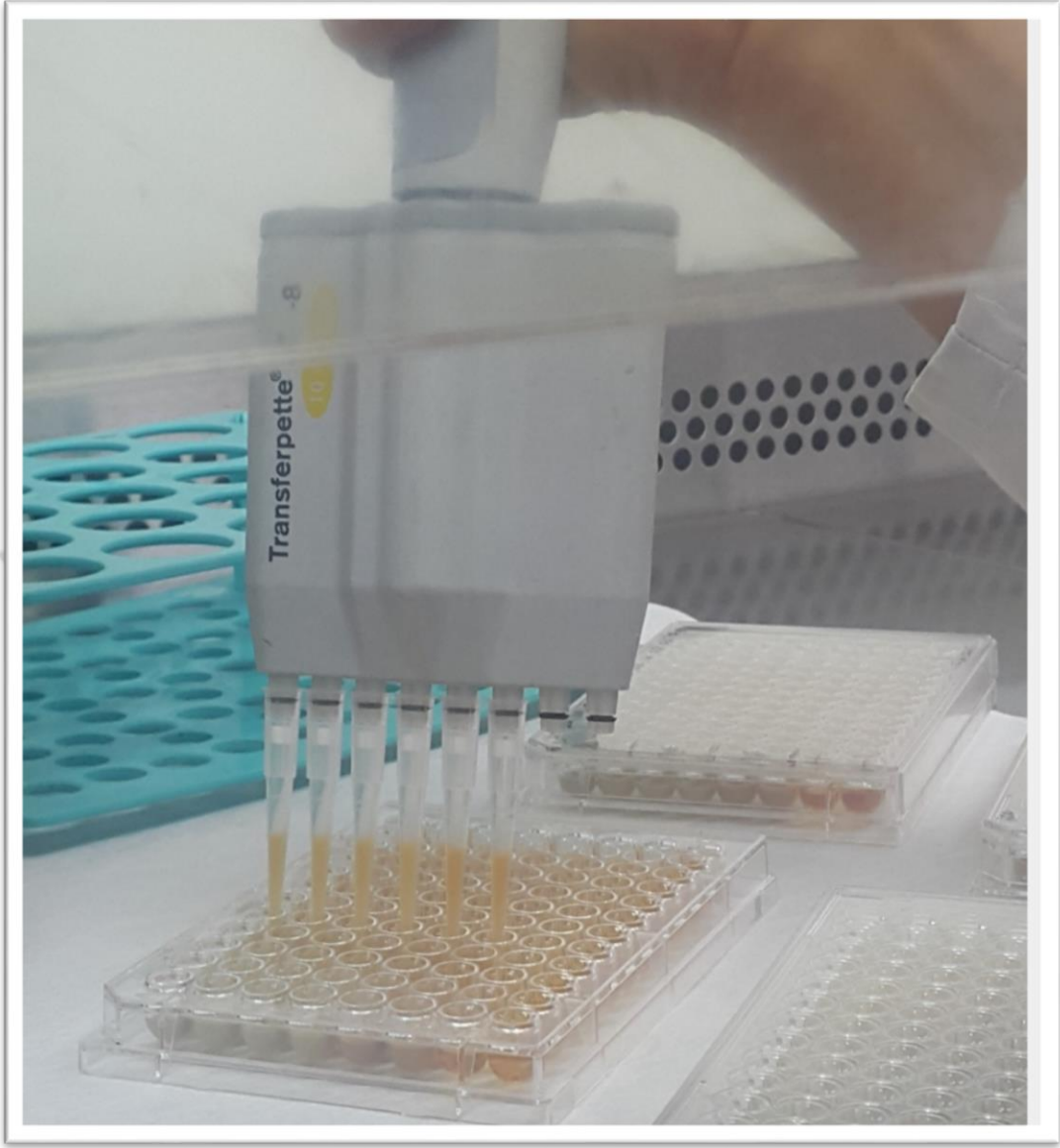
İnkübasyonun süresinin 20. saatinde mikropklarda üreme varlığı; zeolit mineralinin dibe çökmesi nedeniyle gözle ayırt edilemediği için, üremenin varlığının belirlenebilmesi adına indikatör olarak resazurin ilave edilerek değerlendirilmiştir. Resazurin çözeltisinden mikropğun A(100°C), C(200°C), E(400°C) yatay sıra kuyucuklarına ve G (pozitif kontrol), H (negatif kontrol) yatay sıra kuyucuklarına 30’ar µl ilave edilmiş ve renk değişimi için mikropklar 35°C’de 4 saat süresince bekletilmiştir (Şekil 3-16). İnkübasyon süresinin sonunda mikropğun negatif kontrol olan H sırası (7.sıra) hariç diğer kuyucuklarda mavi rengin pembeye dönüştüğü gözlenmiştir.

Zeolitin antifungal etkinliğinin yokluğunu (mikroorganizmanın canlılığını) kanıtlamak için resazurinin ilave edilmediği B(100°C), D (200°C), F (400°C) yatay sıra

kuyucukları ve G (pozitif kontrol), H (negatif kontrol) yatay sıra kuyucuklarından pipetle 1 µl'lik hacim alınarak 1/1000 oranında %0,85'lik tuzlu su ile seyreltilmiş, SDA besiyerine ekilerek petriler 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda meydana gelen üremeler değerlendirilmiştir (Şekil 3-17 ve Şekil 3-18).



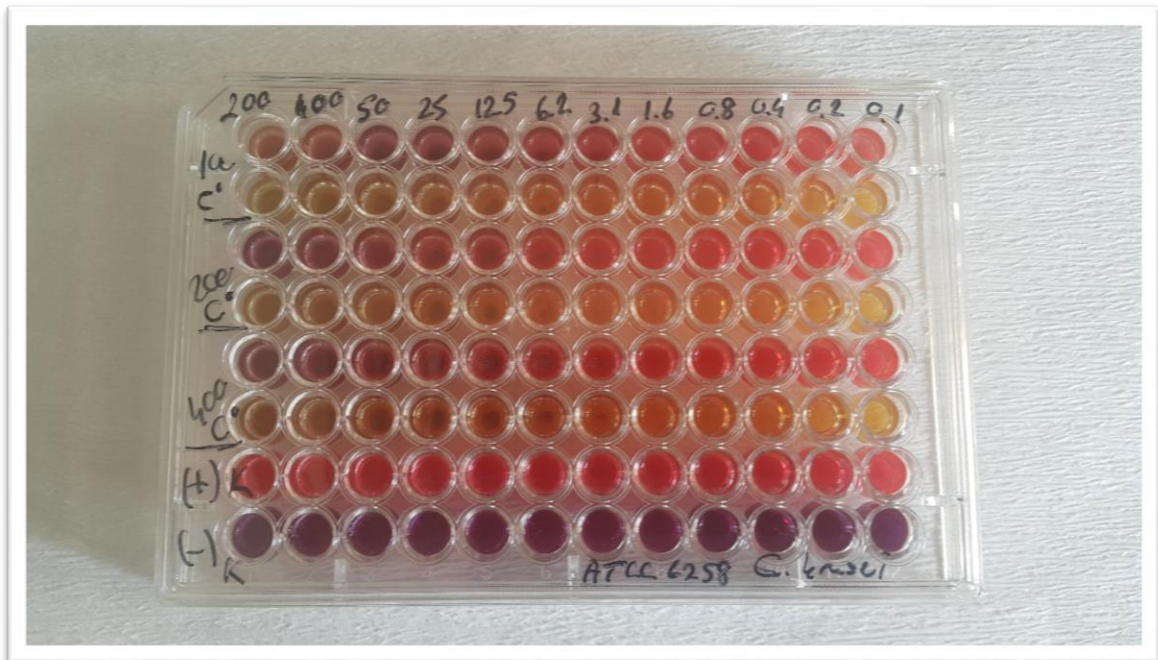
Şekil 3-13: Zeolit süspansiyonunun mikroplığa aktarılması



Şekil 3-14: Zeolitin 3 farklı formunun mikropakta seri dilüsyon işlemi



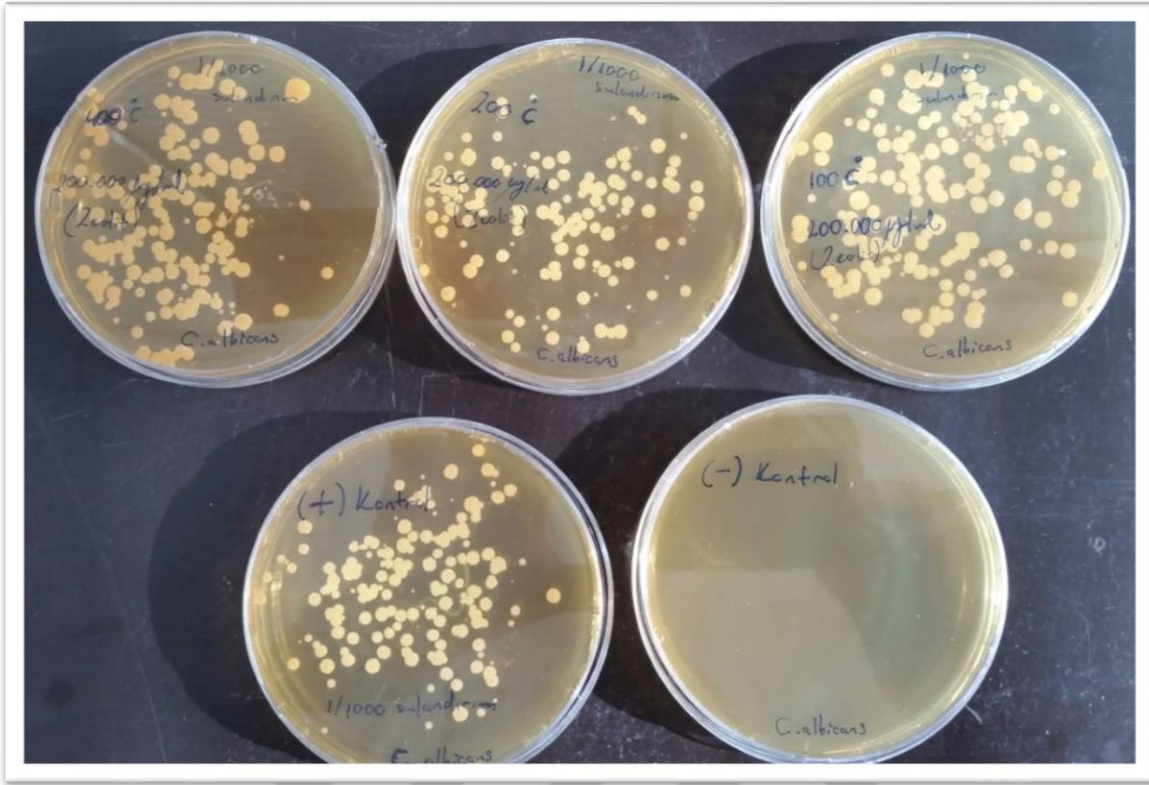
Şekil 3-15: Zeolitin seri dilüsyonu sonrası mikroplağın alttan görünümü



Şekil 3-16: *C. krusei* ATCC6258 için resazurin ilave edilmiş mikropalak görüntüsü



Şekil 3-17: SDA besiyerine ekim gerçekleştirilmesi



Şekil 3-18: *C. albicans*'ın, zeolitin farklı sıcaklık derecelerindeki formlarının 200.000 µg/ml'lik konsantrasyonda SDA'daki üreme görünümü (1/1000 sulandırım)

4. BULGULAR

Çalışmamızda; İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalı laboratuvarının kültür koleksiyonunda bulunan protez stomatitli bireylerin sürüntü örneklerinden izole edilen 114 *Candida* suşu kullanılmıştır. API ID 32 C identifikasyon sistemi kullanılarak yapılmış olan tür düzeyinde tanımlamada en sık izole edilen türlerin sırasıyla *C. albicans* (65; %57), *C. glabrata* (34; %29,9), *C. tropicalis* (6; %5,2), *C. parapsilosis* (3; %2,6), *C. kefyr* (3; %2,6), *C. guilliermondii* (2; %1,8) ve *C. krusei* (1; % 0,9) olduğu belirlenmiştir.

Antifungal duyarlılık deneylerinde flukonazol için 64-0,125 µg/ml; itraconazol için 16-0,0313 µg/ml konsantrasyon aralığı kullanılmıştır. Çalışmamızda kalite kontrol amacı ile *C. parapsilosis* ATCC 22019 ve *C. krusei* ATCC 6258 suşlarının antifungal deneylerinin sonuçları değerlendirmeye alınmıştır. CLSI M27- S4'e (Wayne, 2012) göre deney koşullarının ve sonuçlarının geçerli olabilmesi için kullanılan standart suşların MİK değerlerinin, *C. parapsilosis*'de (ATCC 22019) flukonazol için 2,0-8,0µg/ml; itraconazol için 0,06-0,25µg/ml, *C. krusei*'de (ATCC 6258) flukonazol için 16-64µg/ml; itraconazol için 0,12-0,5µg/ml MİK aralığında olması gerekmektedir. Çalışmamızda kullandığımız standart *C. parapsilosis* ATCC 22019 flukonazol için 2 µg/ml, itraconazol için 0,25 µg/ml; *C. krusei* ATCC 6258 flukonazol için 16 µg/ml, itraconazol için 0,5 µg/ml MİK değerlerini vermiştir. Elde edilen MİK değerleri kılavuzda belirtilen sınır değerler aralığında olduğu için deney koşullarımız ve sonuçlarımız geçerli kılınmıştır.

Protez stomatitli bireylerin sürüntü örneklerinden izole edilen 114 *Candida* suşunun mikrodilüsyon yöntemi ile flukonazol ve itraconazole karşı antifungal duyarlılıkları belirlenmiş ve elde edilen MİK değerleri Tablo 4-1'de verilmiştir.

Tüm candida suşları içinde *C. albicans* suşlarının tamamının (65; %57) flukonazole karşı duyarlı olduğu; itraconazole karşı 63 (%55,2) suşun duyarlı, 1 (%0,9) suşun doza bağlı duyarlı ve 1 (%0,9) suşun ise dirençli olduğu belirlenmiştir.

C. glabrata suşlarının 33'ü (% 28,9) flukonozale duyarlı iken, 1 (%0,9) suşun dirençli olduğu; itrakonazole karşı 17 (%14,9) suşun duyarlı, 10 (%8,7) suşun doza bağlı duyarlı ve 7 (%6,1) suşun ise dirençli olduğu bulunmuştur.

C. tropicalis suşlarında 4 (%3,5) flukonazole duyarlı, 1(%0,9) doza bağlı duyarlı, 1 (%0,9) dirençli; itrakonazole karşı 4 (%3,5) duyarlı, 2 (%1,8) doza bağlı duyarlı suş saptanmıştır.

C. keyfr suşlarının (3; %2,6) tümünün flukonazol ve itrakonazole karşı duyarlı olduğu gözlenmiştir.

C. parapsilosis suşları (3; %2,6) hem flukonazol hem de itrakonazol için duyarlı olarak belirlenmiştir.

C. guillermonti suşlarının (2; %1,8) flukonazol ve itrakonazole dirençli olduğu saptanmıştır.

C. krusei suşunun (1; % 0,9) flukonazole doğal dirençli, itrakonazole ise duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4-1: 114 suşa ait MİK Değerleri tablosu

No	SUŞLAR	FLUKONAZOL MİK		İTRAKONAZOL MİK	
3	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
4	<i>C. albicans</i>	1	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
5	<i>C. albicans</i>	2	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
6	<i>C. albicans</i>	2	Duyarlı	0,125	Duyarlı
7	<i>C. albicans</i>	2	Duyarlı	2	Dirençli

8	<i>C. albicans</i>	0,125	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
9	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
10	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
11	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,125	Duyarlı
12	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
21	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
22	<i>C. albicans</i>	0,125	Duyarlı	0,25	Doza bağlı duyarlı
23	<i>C. albicans</i>	1	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
24	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
25	<i>C. albicans</i>	2	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
26	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
27	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
28	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
29	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
30	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
31	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
32	<i>C. albicans</i>	1	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
35	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
36	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
37	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
38	<i>C. albicans</i>	0,125	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
39	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
40	<i>C. albicans</i>	0,125	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
41	<i>C. albicans</i>	0,125	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
42	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
46	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
47	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
48	<i>C. albicans</i>	0,125	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
49	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
50	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,125	Duyarlı
51	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,125	Duyarlı
54	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
55	<i>C. albicans</i>	2	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
56	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
57	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
64	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı

65	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
66	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
67	<i>C. albicans</i>	0,12	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
68	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
69	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
70	<i>C. albicans</i>	0,125	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
71	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
72	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
76	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
78	<i>C. albicans</i>	0,125	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
80	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
82	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
83	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
84	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
85	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
86	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
88	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
89	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
90	<i>C. albicans</i>	1	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
91	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
94	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
95	<i>C. albicans</i>	0,125	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
96	<i>C. albicans</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
97	<i>C. albicans</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
13	<i>C. glabrata</i>	0,125	Doza bağlı duyarlı	0,0313	Duyarlı
14	<i>C. glabrata</i>	0,5	Doza bağlı duyarlı	0,125	Duyarlı
15	<i>C. glabrata</i>	4	Doza bağlı duyarlı	0,5	Doza bağlı duyarlı
17	<i>C. glabrata</i>	2	Doza bağlı duyarlı	0,5	Doza bağlı duyarlı
18	<i>C. glabrata</i>	1	Doza bağlı duyarlı	0,5	Doza bağlı duyarlı
19	<i>C. glabrata</i>	2	Doza bağlı duyarlı	0,5	Doza bağlı duyarlı
20	<i>C. glabrata</i>	8	Doza bağlı duyarlı	1	Dirençli
34	<i>C. glabrata</i>	1	Doza bağlı duyarlı	0,125	Duyarlı

44	<i>C. glabrata</i>	0,5	Doza bağılı duyarlı	0,25	Doza bağılı duyarlı
45	<i>C. glabrata</i>	1	Doza bağılı duyarlı	0,125	Duyarlı
53	<i>C. glabrata</i>	64	Dirençli	8	Dirençli
58	<i>C. glabrata</i>	0,5	Doza bağılı duyarlı	0,125	Duyarlı
60	<i>C. glabrata</i>	2	Doza bağılı duyarlı	0,25	Doza bağılı duyarlı
61	<i>C. glabrata</i>	1	Doza bağılı duyarlı	0,125	Duyarlı
62	<i>C. glabrata</i>	0,5	Doza bağılı duyarlı	0,25	Doza bağılı duyarlı
63	<i>C. glabrata</i>	1	Doza bağılı duyarlı	0,0625	Duyarlı
74	<i>C. glabrata</i>	1	Doza bağılı duyarlı	1	Dirençli
75	<i>C. glabrata</i>	1	Doza bağılı duyarlı	0,5	Doza bağılı duyarlı
93	<i>C. glabrata</i>	0,25	Doza bağılı duyarlı	0,0313	Duyarlı
98	<i>C. glabrata</i>	0,5	Doza bağılı duyarlı	0,125	Duyarlı
99	<i>C. glabrata</i>	2	Doza bağılı duyarlı	0,125	Duyarlı
100	<i>C. glabrata</i>	4	Doza bağılı duyarlı	1	Dirençli
101	<i>C. glabrata</i>	0,125	Doza bağılı duyarlı	0,0313	Duyarlı
102	<i>C. glabrata</i>	1	Doza bağılı duyarlı	0,0625	Duyarlı
103	<i>C. glabrata</i>	0,5	Doza bağılı duyarlı	0,25	Doza bağılı duyarlı
104	<i>C. glabrata</i>	0,25	Doza bağılı duyarlı	0,0313	Duyarlı
105	<i>C. glabrata</i>	0,125	Doza bağılı duyarlı	0,0313	Duyarlı
106	<i>C. glabrata</i>	0,5	Doza bağılı duyarlı	4	Dirençli
107	<i>C. glabrata</i>	8	Doza bağılı duyarlı	4	Dirençli
109	<i>C. glabrata</i>	16	Doza bağılı duyarlı	4	Dirençli
111	<i>C. glabrata</i>	1	Doza bağılı duyarlı	0,5	Doza bağılı duyarlı
112	<i>C. glabrata</i>	1	Doza bağılı duyarlı	0,0313	Duyarlı
113	<i>C. glabrata</i>	0,5	Doza bağılı duyarlı	0,0313	Duyarlı
114	<i>C. glabrata</i>	0,5	Doza bağılı duyarlı	0,125	Duyarlı
2	<i>C. guilliermondii</i>	≥64	Dirençli	1	Dirençli
79	<i>C. guilliermondii</i>	8	Dirençli	2	Dirençli
33	<i>C. kefyr</i>	0,125	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
43	<i>C. kefyr</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
52	<i>C. kefyr</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı

92	<i>C. krusei</i>	8	Doğal dirençli	0,0313	Duyarlı
1	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
16	<i>C. parapsilosis</i>	1	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
87	<i>C. parapsilosis</i>	1	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
59	<i>C. tropicalis</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
73	<i>C. tropicalis</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
77	<i>C. tropicalis</i>	0,5	Duyarlı	0,0313	Duyarlı
81	<i>C. tropicalis</i>	4	Doza bağlı duyarlı	0,5	Doza bağlı duyarlı
108	<i>C. tropicalis</i>	0,5	Duyarlı	0,125	Duyarlı
110	<i>C. tropicalis</i>	16	Dirençli	0,25	Doza bağlı duyarlı
	<i>C. parapsilosis</i>				
115	ATCC22019	2	2.0-8.0 µg/ml	0,25	0,06-0,25 µg/ml
116	<i>C. krusei</i>				
	ATCC 6258	16	16-64 µg/ml	0,5	0,12-0,5 µg/ml

Deneyleerin ikinci aşamasında zeolitin antifungal etkinliğini değerlendirmek için aynı suşlar kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır. Çalışmamızda zeolitin boşluklu yapısının fazla olması nedeniyle ısıtılarak suyunun buharlaştırılması, böylece birim hacimdeki etken madde miktarının artırılması hedeflenmiş, bu şekilde hazırlanan zeolitin antifungal etkinliğinin de artabileceği düşünülmüştür. Bu amaç ile 25µm çapında taneciklere sahip doğal zeolit 100°C, 200°C ve 400 °C'ye kadar 3 farklı ısıda 3 saat süreyle ısıtılarak suyu uçurulmuş 3 farklı formu kullanılmıştır. Zeolitin 3 farklı formdaki tozlarının RPMI 1640 besiyerinde aseptik koşullarda 200.000µg/ml-98µg/ml'lik son konsantrasyon aralığı kullanılarak antifungal aktivitesi araştırılmıştır.

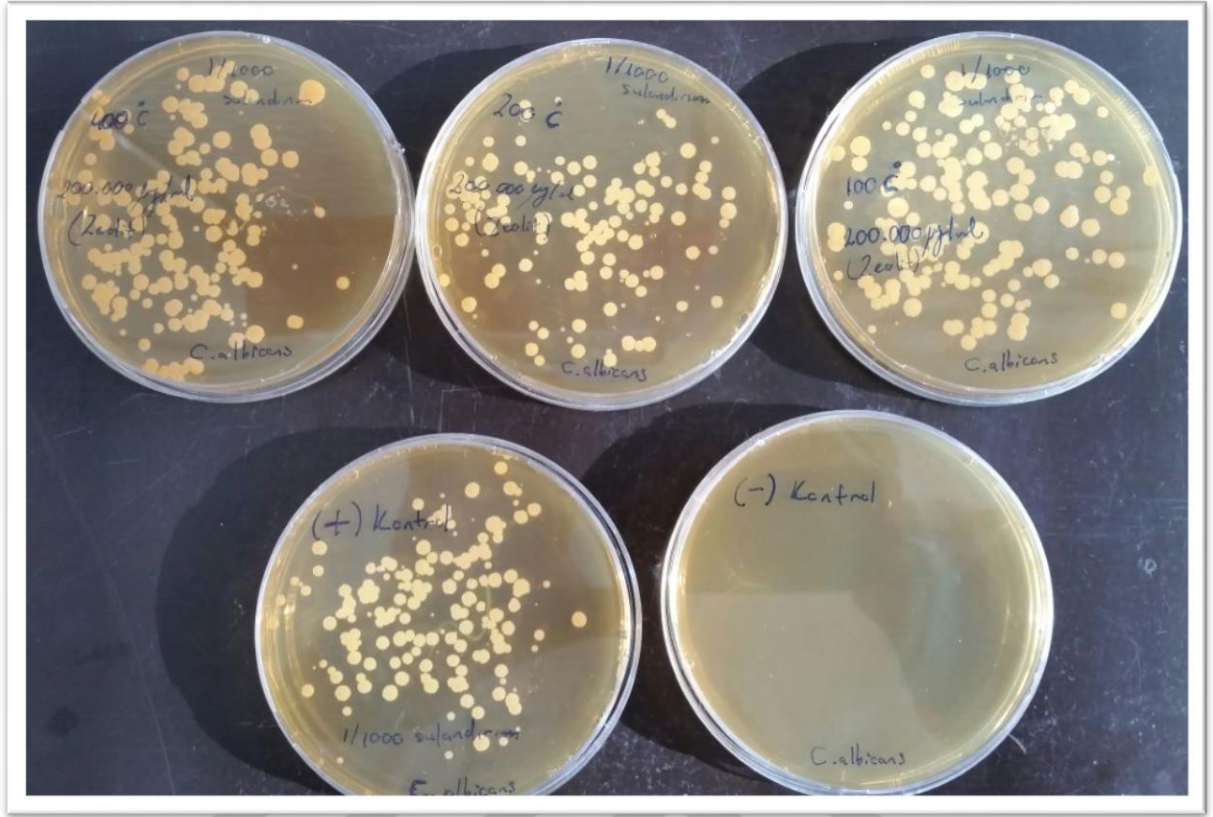
İnkübasyonun süresinin 20. saatinde mikropklarda üreme varlığı; zeolit mineralinin dibe çökmesi nedeniyle gözle ayırt edilemediği için, üremenin varlığının belirlenebilmesi adına indikatör olarak resazurin ilave edilerek değerlendirilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda mikropğun negatif kontrol sırası (7.sıra) hariç diğer kuyucuklarda mavi rengin pembeye döndüğü gözlenmiştir. Resazurinin mavi renkten pembeye dönmesi kuyucuklarda canlı maya hücrelerinin bulunduğunu yani zeolitin

antifungal etkinliğinin bulunmadığını, negatif kontrol kuyucuklarında rengin değişmeyeyp mavi renkte kalması ise deney koşullarının geçerli olduğunu göstermektedir.

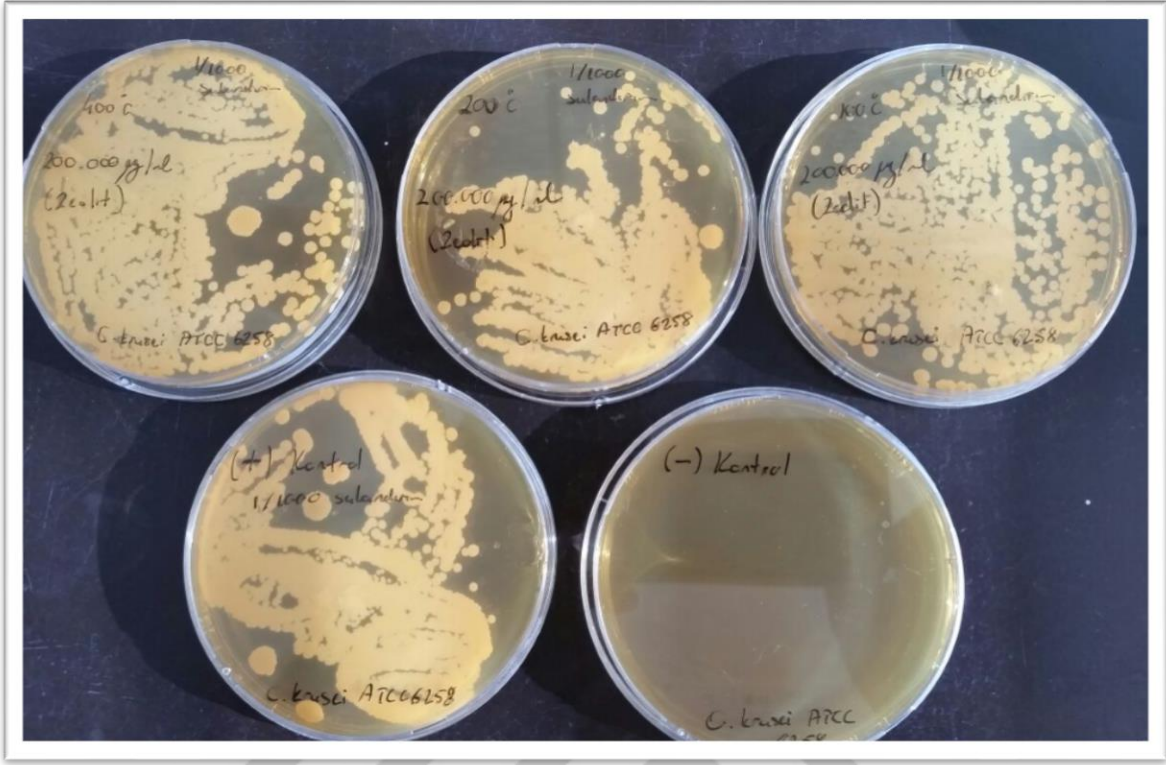
Zeolitin antifungal etkinliğinin bulunmadığını doğrulamak amacı ile 2000000μg/ml-98μg/ml’lik konsantrasyon aralığındaki 12 kuyucuk ile pozitif ve negatif kontrol kuyucuklarından pipetle 1’er μl’lik hacim alınarak 1/1000 oranında %0,85’lik tuzlu su ile seyreltilmiş, SDA besiyerlerine ekilerek petriler 35°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda meydana gelen üremeler değerlendirilmiştir.

Zeolitin farklı konsantrasyonlarının ekildiği SDA’da üreyen *Candida* türlerinin koloni sayısı ile, pozitif kontrol kuyucuğunun ekildiği SDA’da üreyen *Candida* türlerinin ortalama koloni sayısı karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Negatif kontrol kuyucuklarının ekildiği SDA besiyerinde üreme olmaması deney koşullarının ve sonuçlarının geçerli olduğunu göstermiştir. Farklı konsantrasyonlarda SDA’a ekilen ve üreme olan besiyerlerinde yapılan koloni sayımlarında pozitif kontrol grubuna kıyasla herhangi anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

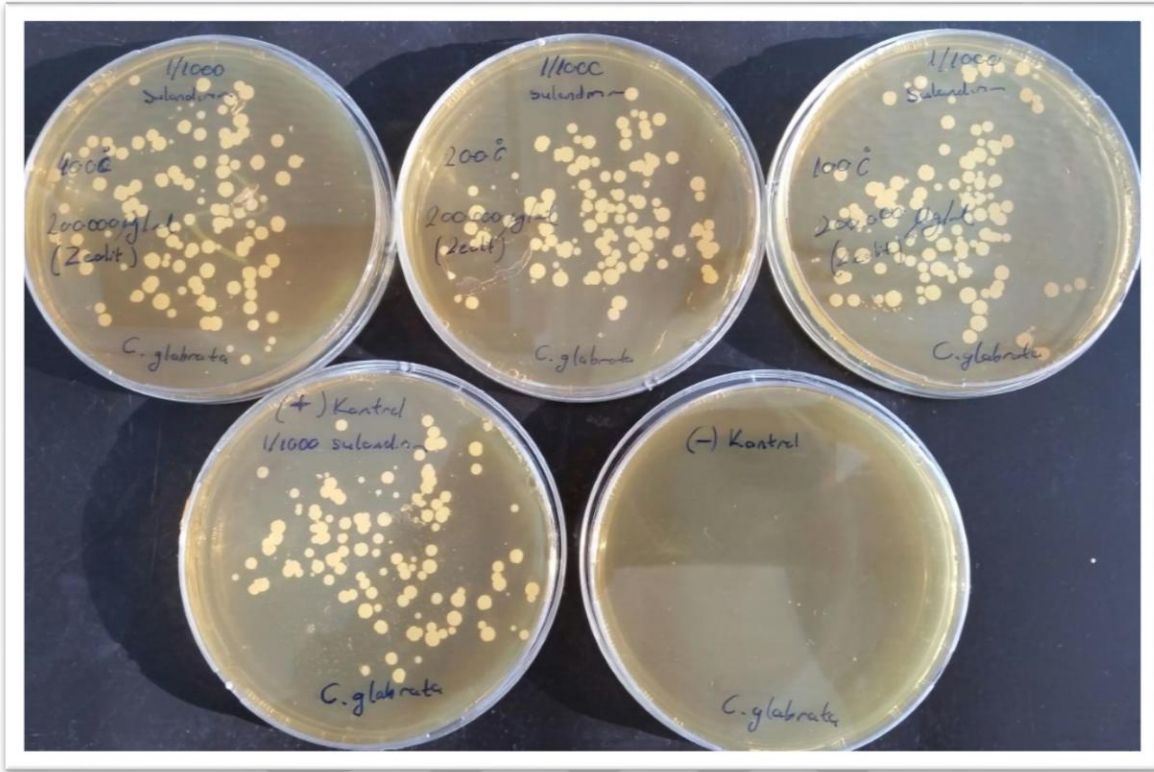
Çalışmamızda; zeolitin, mikrodilüsyon yöntemi ile protez stomatitli hastalardan izole edilen 114 *Candida* türü ve standart kalite kontrol suşlarına karşı antifungal aktivitesinin bulunmadığı belirlenmiş, elde ettiğimiz bu veriler SDA’a ekim yapılmak suretiyle doğrulanmıştır (şekil 4-1, şekil 4-2 ve şekil 4-3).



Şekil 4-1: *C. albicans*'ın, zeolitin farklı sıcaklık derecelerindeki formlarının 200.000 µg/ml'lik konsantrasyonda SDA'daki üreme görünümü (1/1000 sulandırım)



Şekil 4-2 : *C. krusei*'nin, zeolitin farklı sıcaklık derecelerindeki formlarının 200.000 µg/ml'lik konsantrasyonda SDA'daki üreme görünümü (1/1000 sulandırım)



Şekil 4-3: *C. glabrata*'nın, zeolitin farklı sıcaklık derecelerindeki formlarının 200.000 µg/ml'lik konsantrasyonda SDA'daki üreme görünümü (1/1000 sulandırma)

Sonuç olarak çalışmamızın başlangıcında ileri sürdüğümüz zeolitin antifungal aktivitesinin var olduğu ve etkinliğinin 100°C, 200°C, 400 °C'lik sıcaklıklarda elde ettiğimiz farklı formlarında giderek artacağı hipotezinin aksine zeolite ait herhangi bir antifungal etkinlik saptanmamıştır.

5. TARTIŞMA

Protez stomatiti; hastaların kullandığı tam ya da bölümlü protezin oturduğu mukozada meydana gelen enflamasyondur. Genelde semptom vermeyen protez stomatitine sahip bireylerde sıklıkla; mukozalarda kanama ve şişlik, ağız genelinde yaygın bir yanma hissi, kötü ağız kokusu, tat alma duyusunda bozukluk ve değişiklik, ağızda kuruluk, mukozada kaşıntı gibi şikayetlerden söz edilir. Protez stomatiti genellikle yaşlı bireylerde gözlenir ve tam protez kullanıcılarının %35-50'sinde meydana gelebilir. Yaşlılarda daha fazla görülmekle beraber yine de protez stomatiti ile yaş dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Kadınlarda erkeklere göre daha yaygın olarak gözlenir. Bunun nedeni olarak da endokrin eksiklikler, vajinal *Candida* taşıyıcılığı ve demir eksikliği anemisi gösterilmiştir. Protez stomatitinin etiyolojisi ve epidemiyolojisi hakkında çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Arendorf ve Walker, 1979; Alkumru ve Beydemir, 1992; Ak ve ark., 1999; Pires ve ark., 2002; Bilhan ve ark., 2003; 2005)

Protez stomatitinin etiyolojisini belirlemek için yapılan bir araştırmada; kişilerin yaş, cinsiyet, protez hijyeni, protezlerin kullanım süresi, protezlerin gece ve gündüz sürekli kullanım durumları, protezlerin fırçalanarak temizleme sıklığı, sigara kullanım alışkanlıkları ve tükürük pH değerleri kaydedilmiştir. Klinik muayeneyle birlikte bireylerin damaklarından ve protezlerinin iç yüzeylerinden eküvyonla alınan örnekler *C. albicans* varlığı açısından araştırılmıştır. Ayrıca damak yüzeyinden elde edilen sürüntü örneklerinde *C. albicans*'a ait blastospor ve hif yapıları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda, protez stomatiti ile sigara kullanımı, protez hijyeni, *C. albicans* kolonizasyonu ve formasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunurken; protez stomatitiyle yaş, cinsiyet, protezlerin kullanım süresi, protez fırçalanarak temizleme sıklığı ve protezlerin gece gündüz ara vermeden kullanılması arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır (Kulak ve Arıkan., 1993).

Loster ve arkadaşlarının çalışmasında, 2007-2012 döneminde kliniğe başvuran 920 (307 erkek 613 kadın) üst total protez kullanan hasta seçilmiş, hastalar yaşlarına göre 50 yaşından küçük, 51-60 yaş arası, 61-70 yaş arası ve 70'den fazla olmak üzere 4 farklı

gruba ayrılmış, hastaların palatinal mukozalarından smear örneği alınmıştır. Tüm deneklerde maya üreme oranı ile cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmiştir. Her yaş grubunda enfeksiyonun hiç oluşmadığı birey sayısı erkeklerde kadınlardan daha fazla olarak belirlenmiş, en fazla enfeksiyon 50 yaşından küçük kadınlarda tespit edilmiştir. Protez stomatiti oluşumunda yaş ve cinsiyetin önemi vurgulanmıştır (Loster ve ark., 2016).

Bireylerin sigara içme durumları ile *Candida* oranı arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada total proteze sahip olan ve sigara içenlerde *Candida* oranı %64 iken, sigara içmeyen bireylerde bu oran %63 olarak bildirilmiştir. Parsiyel proteze sahip olan ve sigara içen bireylerde bu oran %50 iken, sigara içmeyen bireylerde bu oran %36 olarak saptanmıştır. Doğal diş yapısına sahip olup sigara içen bireylerde *Candida* oranı %25 iken, sigara içmeyen bireylerde bu oran %50 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak sigara içme durumuyla, tam ve bölümlü proteze sahip olan bireylerde *Candida* taşıyıcılığı yüksek olurken, doğal dişli bireylerde durum tam tersi olarak saptanmıştır (Alkumru ve Beydemir, 1992).

Darwazeh ve arkadaşları *Candida*'nın lokalizasyonu ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, *Candida*'ların genelde oral kavitede kolonizasyon oluşturduğunu ayrıca oral *Candida* taşıyıcılarının parmaklarında da sık sık protezlerin elle manipülasyonu nedeniyle, bu mikroorganizmalara diğer bireylere göre daha fazla rastlandığını ifade etmiştir (Darwazeh ve ark., 2001).

Protez stomatitinin oluşumu sonucunda gözlenen mantar enfeksiyonlarına neden olarak *C. albicans* sorumlu tutulmuştur (Davenport 1970; Martin ve Lamb 1982; Bilhan ve ark. 2005). Coco ve arkadaşları, protez stomatiti olan hastalarda tür çeşitliliğinin ve sayısının ağız patolojisi ile ilişkisini araştırdıkları 37 hasta üzerinde yaptıkları çalışmalarında elde ettikleri sonuçları Newton'un inflamasyon sınıflamasına göre değerlendirilmiştir. Sonuçta yüksek inflamasyon etkeni olarak en fazla *C. albicans* ve *C. glabrata* 'nın sorumlu olduğu bildirilmiştir (Coco ve ark., 2008).

Dağıstan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, protez stomatitli 70 hastanın palatinal mukozalarından ve dental protez üzerinden alınan smear örneklerinden en fazla

izole edilen suşun *C. albicans* olduğu (%68,8) , bunu takip eden suşun ise *C. glabrata* (%35,4) olduğu sonucuna varılmıştır (Dağıstan ve ark., 2009).

Yapılan çalışmalarda, protez stomatiti etkeni olarak en fazla sorumlu tutulan *Candida* suşları olması nedeniyle çalışmamız kapsamına *Candida* türleri alınmıştır. Tez çalışmasında kullanılan protez stomatitli bireylerden elde edilen 114 suşluk kültür koleksiyonunda en fazla *C. albicans* (64; %57) ve *C. glabrata* (32; %28.9) izole edilmiş ve bu veriler diğer çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur.

Son yıllarda immun supresif tedavi gören hasta sayısındaki artış, yoğun bakımda yatan hasta sayısının artması, antibiyotik kullanımında meydana gelen artış gibi nedenlerle fırsatçı enfeksiyonların görülme olasılığı artmıştır. *Candida*’lar en sık rastlanılan fırsatçı enfeksiyon etkeni olup, aynı zamanda dental protez kullanan bireylerde de en sık protez stomatitinin etkenidir. Fırsatçı enfeksiyonları önlemek için kullanılan antifungal ajanların uzun dönem kullanımları sonucunda ilaçlara karşı direnç gözlenmektedir (Arendorf ve Walker, 1979; Alkumru ve Beydemir, 1992; Ak ve ark., 1999; Pires ve ark., 2002; Bilhan ve ark., 2003; 2005)

Çalışmamızda, protez stomatitli hastaların inatçı oral *Candida* lezyonlarında sistemik yoldan ilk tercih olarak flukonazol ve itrakonazolün kullanılması, flukonazole karşı azalmış duyarlılık/direnç ortaya çıktığının bilinmesi ve klinik tecrübeler nedeniyle bu ilaçların zeolitle kıyaslanması uygun görülmüştür.

Bilhan ve arkadaşları çalışmalarında *Candida* kaynaklı protez stomatiti tedavisinde etkin olan dört farklı yöntemi [%0.5’lik sodyum hipoklorit çözeltisi, %2’lik klorheksidin glukonat çözeltisi, flukonazol kapsül (100 mg) ve itrakonazol kapsül (100 mg. 1x1) + nistatin (süspansiyon 100 000 IU /ml. 4x1 15 gün /gargara olarak)] karşılaştırılmıştır. Damak mukozasında gözlenen klinik iyileşme değerlendirildiğinde, itrakonazol-nistatin birlikteliğinin diğer tedavi yöntemlerinden daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır (Bilhan ve ark., 2003).

Sümer ve arkadaşları çalışmalarında, *Candida albicans*'a karşı in vitro şartlarda omeprazol ve flukonazolun antifungal etkinliğini karşılaştırmış ve *Candida* suşlarının büyük bir çoğunluğunun 320 µgr/ml gibi yüksek bir omeprazol konsantrasyonuna duyarlı olduğu görülmüştür. Flukonazole karşı *C. albicans* suşlarında azalmış duyarlılık oranlarının, sık kullanım nedeniyle ortaya çıkan dirençten kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Sümer ve ark., 2005).

Karakoç ve arkadaşları çalışmalarında, kan kültürlerinden izole edilen *Candida* ların flukonazol ve vorikonazole karşı duyarlılıklarını araştırmış, izole edilen 88 *Candida* suşunun 30'unun *C. albicans*, 26'sının *C. tropicalis*, 15'inin *C. parapsilosis*, 8'inin *C. glabrata*, 5'inin *C. kefyr*, 4'ünün *C. krusei* olduğunu bildirmiştir. İzole edilen *Candida* suşlarının flukonazol ve vorikonazole duyarlılıkları mikrodilüsyon yöntemi ile incelenmiş, flukonazol için 8'i doza bağımlı duyarlı, 5'i ise dirençli olarak saptanmıştır. Flukonazole karşı dirençli olan suşların vorikonazol için düşük MIK değeri gösterdiği bu nedenle flukonazole dirençli suşlarla oluşan infeksiyonların tedavisinde vorikonazol'un alternatif ilaç olarak kullanılabileceği sonucu bildirilmiştir (Karakoç ve ark., 2007).

Silva ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, AIDS li bireylerin oral kavitelerinden elde edilen 59 *Candida* suşu üzerinde E test ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak flukonazol, itrakonazol, ketokanazol ve amfoterisin B için antifungal duyarlılıkları karşılaştırılmıştır. En çok izole edilen suşun *C. albicans* olduğu, bunu izleyen suşların ise *C. tropicalis* ve *C. krusei* olduğu bildirilmiştir. 52 *C. albicans* suşunun antifungal direncini belirlemek amacıyla mikrodilüsyon ve E test yöntemleri kullanılarak yapılan araştırmada 5 suşun itrakonazole dirençli olduğu; flukonazol için ise mikrodilüsyon yönteminde 9 suşun, E test yönteminde ise 6 suşun direnç gösterdiği sonucuna varılmıştır (Silva ve ark., 2002).

Çalışmamızda 114 *Candida* suşunun oral kandidiyazis tedavisinde en çok tercih edilen sistemik antifungallerden olan flukonazol ve itrakonazole duyarlılığı mikrodilüsyon yöntemi araştırılmıştır. Protez stomatitli hastalardan en sık izole edilen *C. albicans* suşlarının tamamının (65; %57) flukonazole duyarlı olduğu, ikinci en sık izole edilen *C. glabrata* suşlarının ise flukonazole karşı 33'ünün (%28.9) doza bağımlı duyarlı, 1'inin (%0.9) dirençli olduğu saptanmıştır. İtrakonazole karşı *C. albicans* suşlarının

63'ünün (%55.2) duyarlı, 1'inin (%0.9) doza bağı duyarlı ve 1'inin (%0.9) ise dirençli olduğu belirlenmiştir. *C. glabrata* suşlarında itrakonazole karşı 17 (%14.9) suş duyarlı bulunurken, 10 (%8.7) suş doza bağı duyarlı ve 7 (%6.1) suş ise dirençli olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda flukonazol ve itrakonazole için elde edilen sonuçlar yukarıda belirtilen sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur (Silva ve ark., 2002; Sümer ve ark., 2005; Karakoç ve ark., 2007) Ayrıca çalışmamız protez stomatitli bireylerden elde edilen suşlarda antifungal duyarlılık deneyi yapan literatürde başka çalışma olmaması sebebiyle öncü niteliktedir.

Gümüş zeolitin antifungal etkinliğinin olduğunu bildirilen çalışmalardan (Matsuura ve ark., 1997; Nikawa ve ark., 1997; Morishita ve ark., 1998; Abe ve ark., 2004) yola çıkarak çalışmamızda, dirençli ya da doza bağı duyarlı suşların alternatif tedavisinde zeolitin tek başına antifungal madde olarak kullanılabilirliği araştırıldı.

Zeolit, yüksek iyon alışverişi kapasiteli, üç boyutlu kristal yapıya sahip, absorban özelliği olan volkanik bir mineraldir. Kafesi andıran birbiriyle bağlantılı, hidrojen, oksijen, alüminyum ve silikon içermektedir. Zeolitler, endüstride geniş kullanım alanı bulmaktadır. Son yıllarda zeolitin tıp ve diş hekimliği alanında kullanımına yönelik pek çok çalışma rapor edilmiştir. (1998 Matsuura ve ark., 1997; Nikawa ve ark., 1997; Hotta ve ark., Ueshige ve ark., 1999; Abe ve ark., 2004)

Hotta ve arkadaşları, geçici dolgu materyali içerisine çeşitli oranlarda ilave edilen gümüş zeolitin mikro sızıntı ve bakteriyel büyüme inhibisyonu açısından önemini vurgulamıştır. Geçici dolgu materyali içerisine katılan zeolit partiküllerinin, materyalin örtücü özelliğini etkilemediği ve mikro sızıntı açısından önemli derecede farklılık görülmediğini bildirilmiştir. Antibakteriyel özellik değerlendirildiğinde özellikle *S.mutans* ve *S. mitis* için inhibisyon alanları gümüş zeolit içeren örnekler ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Ayrıca bakteriyel büyüme inhibisyon derecesinin geçici dolgu materyaline eklenen gümüş zeolit miktarından bağımsız olduğu ifade edilmiştir (Hotta ve ark., 1998).

Protetik tedavide doku düzenleyicilerin (yumuşak doku astar maddelerinin) geniş bir kullanım alanı vardır. Bir rezarvuvar rolü oynayan doku düzenleyiciler, *C.albicans* ve diğer mikroorganizmaların kolayca kolonize olmasına olanak sağlar. Özellikle yaşlı bireylerde bağışıklık sistemi aktivitesinin azalmasından faydalanan fırsatçı patojen olan *Candida* türleri ağız mukozasında stomatite neden olabilir ve yine protezlerden izole edilen *S. aureus* solunum sisteminde enfeksiyonlara yol açabilir. Bu nedenlerden yola çıkarak yumuşak doku astar maddelerinin içerisine gümüş zeolit ilave edilerek maddenin antifungal ve antibakteriyel özelliklerinden faydalanılarak enfeksiyonların önüne geçilebileceği ifade edilmiştir (Matsuura ve ark., 1997; Nikawa ve ark., 1997; Ueshige ve ark., 1999; Abe ve ark., 2004).

Gümüş zeolit içeren yumuşak doku astar maddelerinin, solunum sistemi enfeksiyonuna neden olan *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans* 'a karşı antimikrobiyal etkisini araştıran Matsuura ve arkadaşları, bu maddelerin 4 haftalık süre sonunda dahi antimikrobiyal etki gösterdiklerini bildirmiştir (Matsuura ve ark., 1997).

Farklı miktarlarda gümüş zeolit içeren doku düzenleyicilerinin (yumuşak doku astar maddelerinin) *C. albicans* üzerine antifungal etkilerini inceleyen Nikawa ve arkadaşları, içerikteki gümüş zeolit miktarına bağlı olarak örneklerin inhibisyon etkilerinin yüksek olduğunu bildirmiş; ancak gümüş zeolit içeren örneklerin antifungal etkinliğinin tükürük varlığında azaldığını saptamıştır (Nikawa ve ark., 1997).

Abe ve arkadaşları gümüş zeolit içerikli astar maddelerinin insan tükürüğü üzerindeki antimikrobiyal etkisini değerlendiren bir çalışma yapmış; 28. günde *S. milleri* ve *P. aureginosa* için antimikrobiyal etki gözlenmezken; *S. aureus*, *C. albicans* ve *metisilin dirençli S. aureus* üzerine antimikrobiyal etki varlığı saptanmıştır (Abe ve ark., 2004).

Morishita ve arkadaşları gümüş zeolit içeren ağız gargaralarının plak formasyonu üzerine etkisini ve antibakteriyel aktivitesini göstermek için in vivo pilot çalışma yapmışlardır. Gargara olarak %3 oranında gümüş zeolit içeren tamponlanmış fosfat tuz (PBS) çözeltisi ve kontrol grubu için ise plasebo gargara olarak %3 oranında zeolit A içeren PBS çözeltisi kullanmışlardır. Ayrıca gümüş zeolitten distile suya ve PBS ye

salınan gümüş iyon miktarı atomik adsorbsiyon tekniği ile değerlendirilmiştir. Distile su içerisinde gümüş iyonu bulunamazken PBS içerisinde gümüş iyon konsantrasyonu 0.53 (0.06ppm) bulunmuştur. Plak formasyonu değerlendirildiğinde gümüş zeolit plak formasyonunu inhibisyon gücü plasebo gargaraya oranla önemli derecede fazladır (Morishita ve ark., 1998).

Inoue ve arkadaşları deiyonize suda gümüş-zeolit bakterisid etkisini değerlendirmişlerdir. Bu aktivite için çözünmüş oksijenin gerekliliğini ve reaktif oksijenin bu aktivitede oynadığı rolü araştırmışlardır. *Escherichia coli* içeren bir süspansiyon hazırlanmış ve içerisine gümüş zeolit ilave edildiğinde *Escherichia coli* nin 5 dk içinde koloni oluşturma özelliğini yitirdiğini bildirmişlerdir. Canlı mikroorganizma miktarında ise bir azalma görüldüğü gözlenmiştir. Süspansiyona sodyum zeolit eklendiğinde ise 60 dk sonra bile kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca bakterisit etkide gümüş miktarının önemli olmadığı oksijenin önemli olduğu ifade edilmiştir. Yapılan çalışmada sodyum zeolit antibakteriyel etkinliğinin olmadığı vurgulanmıştır (Inoue ve ark., 2002).

Kawahara ve arkadaşları anaerobik ortamda gümüş zeolit gram negatif (*Provetella intermedia*, *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Porphyromonas gingivalis*) ve gram pozitif (*Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mutans* ve *sanguis* için) oral bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliğini değerlendirmiş, gümüş zeolit patolojik mikroorganizmalara karşı anaerobik ortamda bile antibakteriyel özelliği gösterdiğini kontrol grubu olarak kullanılan zeolit A'nın bakteriyel büyümenin inhibisyonu üzerine herhangi bir etkisi bulunmadığını ifade etmiştir (Kawahara ve ark., 2000).

Sirikamon ve arkadaşları, agar difüzyon yöntemi ile zeolit ve gümüş zeoliti 10-200gr/L konsantrasyon aralığında kullandıkları çalışmalarında gümüş zeolit antimikrobiyal etkinliğinin var olduğunu, ancak zeolit için antimikrobiyal etkinliğin bulunmadığını ifade etmiştir (Sirikamon ve ark., 2013).

Tek başına doğal zeolit kullanarak (gümüş kullanmadan) yapılan çalışmamızda *Candida* suşları üzerinde herhangi bir antifungal etkinlik gözlenmemiştir. Çalışmalarda etken madde olarak zeolit gümüş ile oluşturulan gümüş zeolit bileşiği kullanılmış ve bu

bileşiğın *C. albicans* üzerine antimikrobiyal etkinliğı gözlenmiştir (Matsuura ve ark., 1997; Nikawa ve ark., 1997; Morishita ve ark., 1998; Abe ve ark., 2004). Buna karşılık zeolitin tek başına kullanıldığı çalışmalarda ise gerek bakterilere gerekse mayalara etkisi olmadığını belirten çalışmalar da bulunmaktadır (Kawahara ve ark., 2000; Inoue ve ark., 2002; Sirikamon ve ark., 2013). Zeolitin antimikrobiyal etkinliğinin var olduğunu ifade eden çalışmalarda gümüş zeolit kullanılırken, etkinliğın olmadığını ifade eden çalışmalarda yapay zeolit ve bizim çalışmamızda doğal zeolit kullanılmıştır. Bu durumda gözlenen antimikrobiyal etkinliğın zeolitten değil, gümüş zeolit bileşiğindeki gümüşten kaynaklandığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca zeolitin etkinliğinin 100°C, 200°C, 400 °C’lik sıcaklıklarda elde ettiğimiz farklı formlarında giderek artacağı hipotezimizin tersine artan sıcaklıklarda elde edilen zeolit formlarında da herhangi bir antifungal etkinlik saptanmamıştır. Çalışmamız doğal zeolitin antifungal etkinliğine bakıldığı ilk çalışma olması nedeniyle öncü niteliktedir.

Sonuç olarak çalışmamızda, günümüzde pek çok kullanım alanı olan zeolitin antifungal etkinliğinin var olduğunu belirten çalışmalarından yola çıkarak, gün geçtikçe artan ilaç direncine zeolit ile alternatif bir çözüm bulunması hedeflenmişti. Ancak yapılan laboratuvar çalışmaları sonucunda, zeolitin literatürdeki yayınlarda gümüşle birlikte kullanılması nedeniyle antimikotik etkinlik göstermiş olduğu, tek başına zeolitin herhangi bir antifungal aktivitesinin olmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte zeolitin yüksek iyon alışveriş kapasitesi, üç boyutlu kristal, mikro gözenekli yapısı, absorban özelliğinin olması, mikro gözeneklerin mikro pencerelerle birleşmesiyle bir, iki ya da üç boyutlu boşluk sistemleri oluşturması, bu boşluklara sığabilecek büyüklükte olan gaz ve sıvı molekülleriyle doldurulabilir olması, polar ya da polarize olabilen moleküllere ilgi göstermesi, seçici olarak katyon değıştirebilme özellikleri nedeniyle iyi bir taşıyıcı molekül olarak kullanılabileceğı düşünölmektedir. Gümüş ile zeolitin birlikte bileşik oluşturmasında, zeolitin molekül yapısındaki boşlukların gümüş iyonları ile doldurulduğu bu nedenle antimikrobial özellik taşıdığı söylenebilir. Bu boşluklu yapı kullanılarak farklı maddelerle zeolit arasında bileşim oluşturularak taşıyıcı molekül olarak ilaç sentezlenmesinde kullanılabileceğı düşünölmektedir.

6. KAYNAKÇA

1. Abe Y, Ishii M, Takeuchii M, Ueshige M, Tanaka S. Effect of saliva on an antimicrobial tissue conditioner containig silver zeolite. *J Oral Rehabil.* 2004; 31:568-73.
2. Abe Y, Ueshige M, Takeuchi M, Ishii M, Akagawa Y. Cytotoxicity of antimicrobial tissue conditioners containing silver-zeolite. *Int J Prosthodont.* 2003. 16:141-4
3. Ak G, Ünür M, Iğdir L. Diabetes Mellitusta Ağızıçi Lezyonların Sıklığının Değerlendirilmesi", Akademik Dental. 1999; cilt.1, ss.16-9,
4. Alexander BD, Perfect JR. Antifungal resistance trends towards the year 2000. Implication for therapy and new approaches drugs 1997; 54: 657-78
5. Alkumru H, Beydemir K. The Prevalence Of Candida Albicans In Complete Denture And Removable Partial Denture Wearers: A Comparative Study. *Journal Of Marmara University Dental Faculty.* 1992; 1:218-22.
6. Alp E. Aromatik Bileşiklerin Zeolit Katalizörler Üzerinde Transalkilasyonu ve Disproporsiyonu. *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara.* 2005; 155.
7. Arendorf T, Walker D. Oral Candidal Populations in Health and Disease. *Br . Dent. J.* 1979; 267-272. 147.
8. Arendorf T, Walker D. Tobacco smoking and denture wearing as local aetiological factors in median rhomboid glossitis. *Int J Oral Surg.* 1984;411-415.
9. Arendorf T, Walker D. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil.* 1987;217-227.
10. Aybal N. Klinoptilolitinin Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Yemlerinde Yem Katkı Maddesi Olarak Kullanımı. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.* 2001; 56.
11. Baran I, Nalçacı R. Self-reported denture hygiene habits and oral tissue conditions of complete denture wearers. *Arch Gerontol Geriatr.* 2009; 237241.

12. Barbeau J, Seguin J, Goulet J, Koninck L, d. Avon S, Lalond B, Deslauries N. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related Stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 5159- 95.
13. Bayraktar G, Ünalın F, Duran Ö, Öğütücü D, Ünür M. Total protez kullanan hastalarda protetik veriler ve protez stomatiti. . *İ Ü Diş Hek Fak Der.* 1997; 3116-3126.
14. Bayram Y, Gültepe B, Özlük S, Güdücüoğlu H. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* kökenlerinin identifikasyonu ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması.. *Van Tıp Derg.* 2012; 177-81. 19(4)
15. Bilhan H, Sülün T, Kutay Ö. Prevalance and Aetiology of Denture Related Stomatitis in Patients Wearing Removable Dentures. *Balk J Stom.* 2005; 191-7.. 9.
16. Bilhan H, Sülün T, Şakar O, Yaylalı D, Balkanlı O. *Candida* Kaynaklı Protez Stomatiti Tedavisinde Dört Farklı Yöntemin Etkinliklerinin Karşılaştırılması. *Dişhekimliğinde Klinik.* 2003; 73-8. cilt 16.
17. Breck D, Robert E. Zeolite molecular sieves. *Structure Chemistry and use.* Florida: Krieger Publishing Company. Inc Malabar. 1984;(s. 1-347).
18. Budtz-Jørgensen E. Etiology, pathogenesis therapy and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand.* 1990; 61–69.
19. Budtz-Jørgensen E, Holmstrup P, Krogh P. Fluconazole in the Treatment of *Candida*- Associated Denture Stomatitis. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* 1988; 63.
20. Budtz-Jørgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An Epidemiologic Study of Yeasts in Elderly Denture Wearers. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 1975; 3:115-9.
21. Campos M, Marchini L, Bernardes L, Paulino L, Nobrega F. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 419-424.
22. Carlsson G. Clinical morbidity and sequelae of treatment with complete dentures. *J Prosthet Dent.* 1997; 17-23.

23. Casemiro L, Martins CG, Pires-de-Souza C. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver-zinc zeolite. *Gerodontology*. 2008; 187-94.
24. Chadha S, Kale SP. Simple fluorescence-based high throughput cell viability assay for filamentous fungi. *Letters in applied microbiology*. 2015; 238-244.
25. Cheng M, Yu K, Tang R. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia from 1996 to 1999. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;48(1):33-7.
26. ChonH, Woo H. Recent Advances And New Horizons Gn Zeolite. Science and Technology. *Elsevier Science*. 1996; 191-227.
27. Chung H, Titley K, Torneck C, Lawrence H, Lawience H, Friedman S. Adhesion of glass ionomer sement sealers to bovine dentin condition with intracanal medications. *J Endod*. 2001; 27:85-8.
28. Cinar C, Ulusu T, Ozçelik B, Karamüftüoğlu N, Yücel H. Antibacterial effect of silver-zeolite containing root-canal filling material. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009; 592-5.
29. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standart- third edition CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standarts Institute; 2008.
30. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth informational Supplement . CLSI document M27-S4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standarts Institute; 2012.
31. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third informational Supplement . CLSI document M27-S3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standarts Institute; 2008.
32. Coco B, Bagg J, Cross L, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida Glabrata* populations assosiated with the pathogenesis of denture stomatitis. *J Oral Microbiol Immunol*. 2008; 377–383.
33. Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. *Br J Biomed Sci* . 2007; 180-189.

34. Courvalin P, Goldstain F, Philippon A, Sirot J. L'Antibiogramme 1985. Edition MPC Brüksel.
35. Cumming C, Wight C, Blackwell C, Wray D. Denture stomatitis in the elderly. . *Oral Microbiol Immunol.* 1990; 82-85.
36. Çınar Ç. Atravmatik restoratif teknikle çürük tedavisinde zeolit kullanımının in vitro değerlendirilmesi. *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü . Pedodonti Anabilim dalı Doktora Tezi*, 2005.
37. Dağıstan S, Aktas A, Caglayan F, Ayyildiz A, Bilge M. Differential diagnosis of denture-induced stomatitis. Candida. and their variations in patients using complete denture: a clinical and mycological study. *Mycoses.*2009; 266271.
38. Danabaş D. Farklı oranlardaki zeolit(Klinoptilolit)in bazı su parametreleri ile gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792)nin gelişimi ve vücut kompozisyonuna etkileri. *Çukurova üniversitesi fen bilimleri fakültesi doktora tezi*. Adana ; 2009.
39. Darwazeh A, Al-Refai S, Al-Mojawel S. Isolation of Candida species from the oral cavity and fingertrips of complete denture wearers. *J. Prosthet. Dent.*2001; 420-3.
40. Davenport J. The Oral Distribution of Candida in Denture Stomatitis. *Br. Dent. J.* 1970; 151-6.
41. Diekema D, Messer S, Brueggemann A. *Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study.* J Clin Microbiol. 2002; 40(4): 1298-302.
42. Dikbas I, Koksall T, Calikkocaoglu S. Investigation of the cleanliness of dentures in a university hospital. . *J Prosthodont Int.* 2006; 294-298.
43. Dixon DM, Fromtling RA. Morphology, taxonomy and classification of the fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington. DC: American Society for Microbiology 1995: 699-708
44. Dorko E, Jenca A, Pilipcinec E, Danko J, Svicky E, Tkacikova L. Candida-associated Denture Stomatitis. *Folia Microbiol.* 2001; 443-6.
45. Dural E. *Farmakoloji.* 2002; İstanbul: Nobel tıp kitapevi.

46. Emami E, Grandmont P, d.Rompré P, Barbeau J, Pan S, Feine J. Favoring trauma as an etiological factor in denture stomatitis. *J Dent Res*. 2008.
47. Er B. Flukonazolün Candida cinsi mayalar üzerine etkisinin disk difüzyon yöntemi ile araştırılması. *İstanbul üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü yüksek lisans tezi*. İstanbul; 2011.
48. Erdem F, Ertem GT, Oral B, Karakoç E, Demiröz AP, Tülek N. Candida Türlerine Bağlı Nozokomiyal Enfeksiyonların Epidemiyolojik ve Mikrobiyolojik Açıdan Değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2012; 637-648. 46(4).
49. Espinel-Ingroff A, Pfaller M. Susceptibility tests methods: yeasts and filamentous fungi ‘. B. E. Murray PR içinde. *Manual of Clinial Microbiology*. 9. baskı’’2007 ; 1972-86. Washinton DC: ASM Press.
50. Etiz P, Kibar F, Ekenoğlu Y, Yaman A. Kan kültürlerinden izole edilen Candida Türlerinin Dağılımının ve antifungal Duyarlılıklarının retrospektif olarak değerlendirilmesi. *ANKEM Derg*. 2015; 29(3):105-113.
51. Farlane TM, Samaranayake L., Clinical Oral Microbiology. *London: Wright*; 1989
52. Figueiral M, Azul A, Pinto E, Fonseca P, Branco F, Scully C. Denturerelated stomatitis: identification of aetioloical and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil*. 2007; 448-455.
53. Figueiral MH, Fonseca P, Lopes MM, Pinto E, Pereira-Leite T, Sampaio-Maia B. Effect of Denture-Related Stomatitis Fluconazole Treatment on Oral Candida albicans Susceptibility Profile and Genotypic Variability. *The Open Dentistry Journal* . 2015; 9.46-51.
54. Fouche M, Slabbert J, Coogan M. Candidal antibodies in patients undergoing treatment for denture stomatitis. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1987. 587-91.
55. Freitas J, Gomez R, Abreu MD. Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians. *J Oral Rehabil*. 2008; 370-374.
56. Gendreau L, Loewy Z. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011; 251-260.

57. Golecka M, Oldakowska-Jedynak U, Mierzwinska E, Adam-czyk-Sosinska E. Candida-associated denture stomatitis in patients after immunosuppression therapy. . *Transplant Proc.*2006; 155–156.
58. Gülen J, Zorbay F, Arslan S. Zeolitler ve kullanım alanları. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi /Karaelmas Science and Engineering Journal* . 2012;2 (1). 63-68.
59. Gültekin B, Eyigör M, Tiryaki Y, Kırdar S, Aydın N. Kan kültürlerinden izole edilen Candida suşlarında Antifungal duyarlılığın ve bazı virülans faktörlerinin araştırılması ve RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul.* 2011; 45(2):306-17.
60. Haidouti C. Inactivation of mercury in contaminated soils using natural zeolites. *Science of the Total Environment.* 1997; 105-109.
61. Hotta M, Nakajima H, Yamamoto K, Aono M. Antibacterial Temporary filling materials the effects of adding various ratios of Ag-Zn-Zeolite. . *J Oral Rehabil.* 1998; 25:485-9.
62. Inoue Y, Hoshino M, Takahashi H, Noguchi T, Murata T, Kanzaki Y, Sasatsu M. Bactericidal activity of Ag-zeolite mediated by reactive oxygen species under aerated conditions. *J Inorg Biochem.* 2002; 92:37-42.
63. Karakoç E, Yazgı H, Aktaş E, Uyanık M. Çeşitli Candida türlerinin iki farklı triazole duyarlılıklarının mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılması. . *The Eurasian Journal of Medicine.* 2007; 39.
64. Kawahara K, Tsuruda K, Morishita M. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent Mater.* 2000; 452-5.
65. Khasawneh S, al-Wahadni A. Control of denture plaque and mucosal inflammation in denture wearers. *J Ir Dent Assoc* . 2002; 132-138.
66. Kim T, Feng Q, Kim J, Wu J, Wang H, Chen G, Cui F. Antimicrobial effects of metal ions(Ag^+ , Cu^{+2} , Zn^{+2}) in hydroxiapatite. *J Mater Sci Mater Med.* 1998; 9:129-34.

67. Koc A, Gokahmetoglu S, Oguzkaya M. Comparison of E test with the broth microdilution method in susceptibility testing of yeast isolates against four antifungals. *Mycoses*. 2000; 43(7-8):293-7.
68. Kovac-Kovacic M, Skaleric U. The prevalence of oral mucosal lesions in a population in Ljubljana. Slovenia. *J Oral Pathol Med* . 2000; 331-335.
69. Köktürk U. Zeolit Madenciligi ve Çevre Sağlığına Etkileri. Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu. Köse ve Kail (eds). 1995; 21-22 Nisan. DEU Üni. İzmir.
70. Kulak Y, Arıkan A. Aetiology of Denture Stomatitis. *Journal Of Marmara University Dental Faculty*. 1993; 307-14.
71. Kulak-Ozkan Y, Kazazoğlu E, Arıkan A. Oral hygiene habits. denture cleanliness. presence of yeasts and stomatitis in elderly people. *J Oral Rehabil*. 2002; 29:300-4.
72. Kuştımur S. Mantarlar ve Sınıflandırılması. *Tıp ve Dişhekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji* 2004; 1082-1088. Güneş Kitabevi.
73. Kuzucu Ç, Yetkin G, Çalışkan A. Bir yıl içerisinde kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *Erciyes tıp derg* . 2007; 29(2):115-119.
74. Lee WS, Kommary L. New method for detecting in vitro inactivation of penicillins by *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemother*. 1976; 10:664-656
75. Loster J, Aneta W, Loster B. Correlation between age and gender in *Candida* species infections of complete denture wearers: a retrospective analysis. *Clinical interventions in Aging*. 2016 ;11:1707-1714.
76. Martin M, Lamb D. Frequency of *Candida albicans* serotypes in patients with denture-induced stomatitis and in normal denture wearers. *J .Clin. Pathol*. 1982; 888-91. 35
77. Martin A, Palamino JC. Drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*. Colorimetric Redox Indicator (CRI), Procedure Manual. Version 06-2012.

78. Maruo Y, Sato T, Hara T, Shirai H. The effect of diabetes mellitus on histopathological changes in the tissues under denture base bearing masticatory pressure. *J Oral Rehabil.* 1999; 345–355.
79. Matsuura T, Abe Y, Sato Y, Okamoto K, Ueshige M, Akagawa Y. Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver zeolite. *J Dent.* 1997; 25:373-7.
80. Mihaly-Cozmuta L, Mihaly-Cozmuta A, Peter A, Nicula C, Tutu H, Silipas D, Indrea E. Adsorption of heavy metal cations by Na-clinoptilolite: Equilibrium and selectivity studies. *J Environ Manage* . 2014; 69-80.
81. Mikkonen M, Nyssönen V, Paunio I, Rajala M. Oral hygiene, dental visits and age of denture for prevalence of denture stomatitis. *Community Dent Oral Epidemiol* . 1984; 402-405.
82. Milillo L, Muzio L, Carlino P, Serpico R, Coccia E, Scully C. Candida-Related Denture Stomatitis: A Pilot Study of the Efficacy of an Amorolfine Antifungal Varnish. *The International Journal of Prosthodontics.* 2005; 55-9.
83. Mısırlıgil A. Total protezlerin uygulama öncesi ve uygulama sonrası ağız mikroflorasının aerop değerlendirilmesi. *Ank Üniv Diş Hek Fak Derg.* 1981;13-17.
84. Mısırlıgil A. Mikrop Florası ve Oral Mikrofloralar. *Tıp ve Dişhekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji.* 2004; 139-145
85. Monroy T, Maldonado V, Martinez F, Barrios B, Quindos G, Vargas L. Candida albicans, Staphylococcus aureus and Streptococcus mutans colonization in patients wearing dental prosthesis. *Oral Medicine And Pathology.* 2005; 27-39.
86. Morishita M, Miyagi M, Yamasaki Y, Tsuruda K, Kawahara K, Iwamoto Y. Pilot study on the effect of a mouthrinse containing silver zeolite on plaque formation. *J Clin Dent.* 1998; 9;94-6.
87. Mumcu G, Cimilli H, Sur H, Hayran O, Atalay T. Prevalence and distribution of oral lesions: a cross-sectional study in Turkey. *Oral Dis.* 2005; 81-87.
88. Mumpton F. La Roca Magica : uses of natural zeolites in agriculture and industry. *Proc Natl. Acad. Sci.* 1999; 96:3463-3470.

89. Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington. DC: ASM Press.2007.
90. Natto S, Baljoon M, Bergström J. Tobacco Smoking and Periodontal Health in a Saudi Arabian Population. *Periodontol.* 2005; 1919-26.
91. Nevalainen M, Närhi T, Ainamo A. Oral mucosal lesions and oral hygiene habits in the home-living elderly. *J Oral Rehabil* . 1997; 332-337.
92. Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T, Rahardjo M, Murata H, Nakanoda S. Antifungal effect of zeolite incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. *J Oral Rehabil.* 1997; 24:350-7.
93. Olsen I. Denture stomatitis occurrence and distribution of fungi. *Acta Odont. Scand.* 1974;329-33.
94. Özbayrak S. Protez stomatitisi. *Ağız Hastalıkları Atlası. Tanı Kriterleri. Ayırıcı Tanı Ve Tedavi Yaklaşımları.* 2003 ;162-4
95. Öztürk T, Özseven A, Çetin ES, Kaya S. Kan kültürlerinden izole edilen kandida suşlarının tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması. *Kocatepe tıp dergisi* . 2013;14:17-22
96. Pascual A. Pathogenesis of catheter-related infections: Lessons for new designs *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 256-264
97. Patel V, Santerre J, Friedman S. Supresion of bacterial adherence by experimental root canal sealers. *J Endod.* 2000;26:20-4.
98. Pavelic K. *Medical applications of zeolites. in Handbook of Zeolite Science and Technology.* New York: Dekker. 2003
99. Pfaller M, Castanheira M, Messer S, Moet G, Jones R. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp..C. neoformans and *A. fumigatus*:application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surv. prog. *Diagn Microbiol Infect Dis.*2009
100. Pietruski J, Pietruska M, Jablonska E, Sacha P, Zaremba M, Stokowska W. Interleukin 6 tumor necrosis factor alpha and their soluble receptors in the blood

- serum of patients with denture stomatitis and fungal infection. *Arch Immunol Ther Exp.* 2000;48:101-5.
101. Pires F, Santos E, Bonan P, Almeida OD, Lopes M. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J. Oral Rehabil.* 2002; 11:15-9.
 102. Pittet D, Li N, Woolson RF, Wenzel RP. Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial blood-stream infections: A 6 year validated, population-based model. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 1068-1078.
 103. Renner R, Lee M, Andors L, McNamara T, Brook S. The role of *C. albicans* in denture stomatitis. *Oral Surg.* 1979; 32:3-8.
 104. Richardson MD, Jones BL. Therapeutic guidelines in systemic fungal infections, Current Medical Literature. 2001; 2nd ed, s: 34
 105. Ritchie G, Fletcher A, Main D, Prophet A. The etiology, exfoliative cytology and treatment of denture stomatitis. *J Prosthet Dent* . 1969;22.
 106. Saki T, Knuuttila M, Laara E, Anttila S. The association of yeasts and denture stomatitis with behavioral and biologic factors. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 1997;62:4-9.
 107. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, Serpico R. *Candida* associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011; 139-143.
 108. Samaranayake L. Nutritional factors and oral candidosis. *J. Oral Pathol.* 1986;61-5.
 109. Saracli M, Gumral R, Gul H, Gonlum A, Yildiran S. Species distribution and in vitro susceptibility of *Candida* bloodstream isolates to six new and current antifungal agents in a Turkish tertiary care military hospital. recovered through 2001 and 2006. *Mil Med.* 2009;174:860–865.
 110. Sarıoğlu M. Removal of Ammonium From Municipal Wastewater using Natural Turkish (Dogantepe) Zeolite. *Separation and Purification Technology.* 2005;41: 1-11.
 111. Sentürk D, Demirel R, Doran I. Doğal Zeolitlerin Hayvancılıkta Kullanım Olanakları. *HR. Ü.Z.F. Dergisi.* 2010;13-20

112. Shulman J, Hidalgo FR, Beach M. Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. *J. Oral Pathol Med.* 2005;340-6.
113. Silva MR, Costa MR, Miranda A, Fernandes O, Costa C, Paula C. Evaluation of E test and macrodilution broth method for antifungal susceptibility testing of *Candida* sp. strains isolated from oral cavities of AIDS patients. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 2002; 44 (3):121-125, May-June.
114. Sirikamon S, Toemsak S, Boonyanit T, Sroisiri T, Taweethai A, Surachai D, Theeralaksna S. Antimicrobial effects of silver zeolite, silver zirconium phosphate silicate and silver zirconium phosphate against oral microorganisms. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine.* 2013; 47-52.
115. Solomon E, Udani T. A quantitative estimation of residual monomer in heat cure methyl methacrylate denture base resins processed under varying conditions of time and temperature. *Journal of The Indian Dental Association.* 1973;147–153.
116. Stafford G, Handley R. Transverse bend testing of denture base polymers. *J Dent.* 1975;3:251-255.
117. Sutton DA: *Candida* species. Fothergill AW (ed.), Rinaldi MG. *Guide to Clinically Significant Fungi*. 1st ed. Baltimore. Williams & Wilkins 1998: 270-311.
118. Sümer Z, Kaya S, Çetin A, Hakgüden Y. *Candida Albicans* üzerine omeprazolün in vitro antifungal etkisinin flukonazol ile karşılaştırılmalı çalışması. *C.Ü Tıp Fakültesi Dergisi.* 2005;27(2):74-78.
119. Tarçın BG. Oral Candidosis: Aetiology. Clinical Manifestations. Diagnosis and Management. *MÜSBED* . 2011;1(2):140-148.
120. Tepe Y, Dinler Z, Türkmen M. Zeolit ve Yetiştiricilikte Kullanımı. *Sucul Yaşam Dergisi.* 2005;5: 47-51.
121. Tezal M, Wactawski-Wende J, Grossi S, Dmochowski J, Genco R. Periodontal Disease and the Incidence of Tooth Loss in Postmenopausal Women. *J. Periodontol.* 2005;1123-8.
122. Thom D, Davies J, Santerre J, Friedman S. The hemolytic and cytotoxic properties of a zeolite containing root filling material in-vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Endod.* 2003;95:101-8.
123. Tindall, Odds F. *Candida and Candidiasis.* London: Bailliere; 1988; 4.

124. Tokman B, Oygür T. Candidiazis Şüphesi Olmayan Mukozal Lezyonlarda *C. albicans* Üzerine Bir Çalışma. *G. Ü. Dishek. Fak. Derg.* 1999; 15-20.
125. Topçu Willke A. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2002; 296
126. Tuckfield W, Worner H, Guerin B. Acrylic resins in dentistry. Part II Their use for denture construction. *Australian J. Dent* . 1943; 1–25
127. Tümbay E. Candida türleri. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ustaçelebi Ş. (ed.). 1999
128. Ueshige M, Abe Y, Sato Y, Tsuga K, Akagawa Y, Ishii M. Dynamic Viscoelastic properties of antimicrobial tissue conditioners containing silver- zeolite. *J Dent*. 1999; 27:517-22
129. Unur M , Doğan-Onur Ö. Ağız hastalıklarının Tanı ve Tedavisi. Quintessence Yayıncılık. İstanbul, 2003.
130. VandenAbbeele A, Meel H, d. Ahariz M, Perraudin. J, Beyer I & Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology*. 2008; 222-228.. 25.
131. Verran J, Maryan C. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent*. 1997;535-539.
132. Wayne P. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard- Third Edition. CLSI Document M27-A3.* 2008.
133. Webb B, Thomas C, Willcox M, Harty D, Knox K. *Candida* associated denture stomatitis. Aetiology and management : A review. *Aust Dent J*. 1998.
134. Wilder JA, Swift JE, May JK, Thompson J, McDougal R. Effect of finishing technique on the microleakage and surface texture of resin modified glass ionomer restorative materials. *J Dent*. 2000; 28:367-73.
135. Williams D. On the mechanisms of biocompatibility. *J. Biomater*. 2008; 2941-2953.
136. Wright J, Lam K, Hansen D, Burrell R. Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. *Am J Infect Control*. 1999; 344-350.
137. Yeğenoğlu Y. Antifungal direnci gösteren mantarlar. *ANKEM derg*. 2012;26(ek2):254-260.

- 138.Yılmaz HY, Yumul Ç. Metal ve akrilik kaideli protezlerin aerop bakteriler yönünden etkinliklerinin kıyaslanması. *Ank Üniv Diş Hek Fak Derg.* 1981;8: 1-9.
- 139.Yücel H, Çuflaz A. Doğal ve yapay zeolitlerin endüstriyel kullanım alanları . *ODTÜ Uygulamalı araştırmalar dergisi.* 1984;3:1-20.
- 140.Yücel H. Zeolitler ve Uygulama Alanları. 3. *Ulusal Kil Sempozyumu.* Ankara. 1987; 391-402
- 141.Yücesoy V, Baloş K. Sigara içen ve içmeyen Bireylerde Periodontal Durum ve Tedavi ihtiyacının Değerlendirilmesi. *G. Ü. Dishek. Fak. Derg.*1998; 81-7.
- 142.Zepelin M, Kunz L, Rüche R, Reichard U, Weig M, Groß U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. *J Antimicrob Chemother* . 2007;424-8.
- 143.Zer Y, Balcı İ. Yoğun bakım ünitesindeki hastalardan izole edilen *Candida* suşlarının identifikasyonu ve antifungal duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2002;32(3):230-4.

ZEOLİTİN ANTİFUNGAL ETKİNLİĞİNİN DİĞER ANTİFUNGAL İLAÇLARA GÖRE KARŞILAŞTIRILMALI OLARAK İNCELENMESİ

ORIJİNALLIK RAPORU

% 15	% 13	% 5	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.ankemdernegi.org.tr	% 3
	İnternet Kaynağı	
2	acikarsiv.ankara.edu.tr	% 2
	İnternet Kaynağı	
3	library.cu.edu.tr	% 2
	İnternet Kaynağı	
4	Submitted to Anadolu University	% 1
	Öğrenci Ödevi	
5	fbetezbankasi.gazi.edu.tr	% 1
	İnternet Kaynağı	
6	www.klimik.org.tr	% 1
	İnternet Kaynağı	
7	Submitted to Gaziantep Aniversitesi	% 1
	Öğrenci Ödevi	
8	traglor.cu.edu.tr	<% 1
	İnternet Kaynağı	