



**T. C.  
SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
GÜLHANE SAğLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ANKARA**

**TROMBOSİTLERİN *CANDIDA ALBICANS*  
ÜZERİNE ANTİFUNGAL ETKİNLİğİNİN  
ARAğTIRILMASI**

**Berksan ŞİMŞEK  
Uzman Doktor**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2018**





T. C.  
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
GÜLHANE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ANKARA

**TROMBOSİTLERİN *CANDIDA ALBICANS*  
ÜZERİNE ANTİFUNGAL ETKİNLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Berksan ŞİMŞEK**

**Uzman Doktor**

Sağlık Bilimleri Üniversitesi  
Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğünün  
Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbı İçin ngrdĞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Olarak HazırlanmıŐtır.

**TEZ DANIŐMANI**

**Rıza Aytaç ÇETİNKAYA**

**Doktor Ğretim yesi**

**ANKARA  
2018**

## TEZ KABUL ONAYI

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane/Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbı Ana Bilim Dalında  
Berkas ŞİMŞEK tarafından hazırlanan  
Trombositlerin Candida Albicans Üzerine  
Antifungal Etkinliğinin Araştırılması  
başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından  
OY BİRLİĞİ ile YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Dr.Öğr.Üyesi Rıza Aytaç ÇETİNKAYA  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sultan Abdülhamit Han SUAM  
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~.

İMZA

.....

**Üye:** Prof.Dr. Ayşe KALKANCI  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~.

İMZA

.....

**Üye:** Prof.Dr.Mehmet BAYSALLAR  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~.

İMZA

.....

**Üye:** Prof.Dr. Şinasi Taner YILDIRAN  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~.

İMZA

.....

**Üye:** Prof.Dr. İsmail Yaşar AVCI  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbı Anabilim Dalı Başkanlığı  
Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~.

İMZA

.....

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 05/ 07 / 2018

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane/Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile  
onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Ömer AZAL  
Gülhane/Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimi sonrası meslek yaşantımda Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbı alanını tanımamı sağlayan ve onların açtığı bu yoldan yürümeye karar verdiğimde “sen yaparsın” diyerek desteklerini esirgemeyen çok değerli ağabeylerim Uzm. Dr. Soner YILMAZ ve sonrasında tez danışmanım da olan Dr. Öğ. Üyesi Rıza Aytaç ÇETİNKAYA’ya, aynı şekilde şehirlerarası bir eğitime başlama konusunda soru işaretleri taşıırken beni cesaretlendiren ve desteğini sonuna kadar hissettiğim hocam Prof. Dr. İsmail Yaşar AVCI’ya şükran ve saygılarımı arz ederim.

Yüksek İlisans eğitimim boyunca beraber çalışma imkânı bulduğum, her zaman desteğini hissettiğim Uzm. Dr. Ercan YENİLMEZ’e, aramıza yeni katılmasına rağmen kritik noktada destek veren Uzm. Dr. Sinem Akkaya IŞIK’a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hep yanımda olan, sevgi, destek ve fedakârlıklarından dolayı sevgili annem, babam ve kardeşlerime; bugünlere gelmem için desteğini, sonsuz sevgisini, anlayışını ve sabrını hissettiğim, varlığıyla yaşama umutla bakmama sebep olan sevgili eşim Alfrida ŞİMŞEK’e sonsuz sevgi ve minnetlerimi sunarım. Canlarım ULUKAN ve ALPEREN; Sizlere vakit ayırmam gereken zamanlarda yüksek lisans eğitimim için zaman zaman Ankara’ya gitme ve ekstra çalışma mecburiyetinde olup birlikte oyun zamanımızdan çaldığım için her ikinizden de özrü bir borç bilirim.

**Berksan ŞİMŞEK**

**Uzman Doktor**

**Ankara - 2018**

## ÖZET

### **Trombositlerin *Candida albicans* Üzerine Antifungal Etkinliğinin Araştırılması**

Mantar enfeksiyonlarında etken olarak en sık *Candida* türleri, özellikle de *Candida albicans* saptanmaktadır. Bu çalışmada gönüllülerden elde edilen trombositten zengin plazmanın (TZP) *C. albicans* ATCC 10231 suşuna karşı in vitro antifungal etkinliği ile bu etkinlikte rol oynayabileceği düşünülen bazı kemokin ve kinosidinlerin olası etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Dokuz gönüllüden Magellan PRP™ kiti kullanılarak 3'er ml TZP elde edildi. Otolog trombin eldesi için %10'luk kalsiyum glukonat kullanıldı. Otolog trombin ile aktive edilen TZP'nin, son maya konsantrasyonu  $1 \times 10^3$  kob/ml ve  $1 \times 10^4$  kob/ml olan *C. albicans* izolatu üzerindeki antifungal etkinliğinin ortaya konulması amacıyla 1., 2., 4., 8. ve 16. saatlerde Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) yüzeyine ekimleri yapıldı. 30°C'de 18-24 saatlik inkübasyon sonrası koloniler sayıldı. Aynı zamanda her ekim saatinde kemokin ve kinosidinler [(Trombosit Faktör-4 (Human PF-4), İnterlökin-8 (Human IL-8) ve Timosin- $\beta$ 4 (Human TMSB4)] eş zamanlı olarak ELISA yöntemiyle ölçüldü.

Trombositten zengin plazmadaki medyan Beyaz Küre (WBC) sayısı;  $49,4 \times 10^3/\mu\text{l}$ , medyan trombosit sayısı  $2165 \times 10^3/\mu\text{l}$  olarak saptandı. TZP'deki trombosit ve WBC verimliliğinde yaklaşık 9 kat artış saptandı. Başlangıç maya konsantrasyonu  $10^3$  olan TZP grubunun (TZP- $10^3$ ) saatlere göre üreyen koloni medyan değerleri sırasıyla 1., 2., 4., 8., ve 16. saatler için 3, 7, 34, 143 ve 500 iken başlangıç maya konsantrasyonu  $10^4$  olan TZP grubu (TZP- $10^4$ ) için bu değerler 19, 48, 166, 500 ve 500'dü. Aynı saatler için başlangıç maya konsantrasyonu  $10^3$  olan PBS (kontrol) grubunun koloni medyan değerleri ise sırasıyla 242, 280, 500, 500 ve 500'dü.

TZP- $10^3$ 'ün PBS-kontrol grubuyla karşılaştırıldığında antifungal etkinliğinin 8. saatte halen devam ettiği, 16. saatte ise kaybolduğu görüldü. İki grup arası 8. saatteki koloni üremelerindeki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0,05$ ). TZP- $10^4$ 'ün antifungal etkinliğinin 4. saatte devam ettiği, 8. saatte bu etkinliğin azaldığı,

16. saatte ise antifungal etkinliğin ortadan kalktığı görüldü. Her iki grupta eşit miktarda TZP kullanılmış olması ve buna bağlı ortama salınan kemokin ve kinosidin miktarı aynı olmasına rağmen TZP  $10^3$  grubunun daha etkin bulunmasında *C. albicans* konsantrasyonunun önemli olabileceği düşünüldü.

ELISA yöntemiyle her iki TZP'li grupta IL-8 seviyelerinde saatlere göre artış olmakla birlikte *C. albicans*'a karşı antifungal etki tespit edilmedi. TMSB4 miktarı yoğun trombosit varlığına bağlı olarak PBS-kontrol grubuna göre TZP'li gruplarda 7-10 kat daha yüksekti. TZP gruplarında ilerleyen saatlerde TMSB4 değerlerinde antifungal etkinliğine bağlı olarak gerçekleştiği değerlendirilen düşme saptandı. PF-4, TZP- $10^3$  ve TZP- $10^4$  üzerinde antifungal etkinlikte değildi.

Trombositten zengin plazmanın *C. albicans* ve diğer mantar enfeksiyonlarında etkili olabilmesi için, en yüksek trombosit ve lökosit değerlerinin elde edilebileceği tam otomatize kapalı sistemlerin kullanılmasının önemli olduğu düşünülmektedir. En düşük konsantrasyonda en yüksek trombosit değerleri elde edilen çalışma grubumuzda dahi literatürdeki çalışmalardaki gibi *C. albicans* üremeleri tamamen yok edilememiştir. Hastalarda kullanılan ilaçlar gibi tekrarlayan dozlarda TZP uygulamaları ile antifungal etki daha uzun sürelerle erişebilir hatta üremeleri tamamen baskılayacak değerler elde edilebilir. Ayrıca trombositlerin antifungal etkinliğinde rol oynayabileceği düşünülen bütün kemokin, kinosidin ve benzeri diğer molekülleri kapsayan geniş çaplı bir projeye gereksinim duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Candida albicans*, Antifungal Direnci, Trombositten Zengin Plazma.

**Destekleyen Kurumlar:** Çalışmamız Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminden mali destek alınarak yapıldı.

**Yazar Adı:** Uzm. Dr. Berksan ŞİMŞEK

**Danışman:** Dr. Öğ. Üyesi Rıza Aytaç ÇETİNKAYA

## ABSTRACT

### Investigation of Antifungal Activity of Platelets on *Candida albicans*

*Candida* species, especially *Candida albicans*, are the most common pathogen detected in fungal infections. In this study, we aimed to evaluate the in vitro antifungal activity of volunteer-derived platelet rich plasma (PRP) against *C. albicans* ATCC 10231 strain and the possible effect of certain chemokines, kinocidins that might play a role in this activity.

Three ml of PRP from nine volunteers were derived by using Magellan PRP™ kit. 10% calcium gluconate was used to obtain autologous thrombin. *C. albicans* isolates with a final yeast concentration of  $1 \times 10^3$  cfu/ml and  $1 \times 10^4$  cfu/ml were inoculated on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) at the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> hours of incubation in order to reveal the antifungal activity of autologous thrombin-activated PRP. The colonies were counted after 18-24 hours of incubation at 30°C. At the same time, chemokines and kinocidins [(Platelet Factor-4 (Human PF-4), Interleukin-8 (Human IL-8) and Thymosin- $\beta$ 4 (Human TMSB4)] were measured simultaneously by ELISA method.

The median values of white blood cells (WBC) and platelets in PRP were detected as  $49,4 \times 10^3/\mu\text{l}$  and  $2165 \times 10^3/\mu\text{l}$ , respectively. Approximately 9-fold increase in platelet and WBC efficacy in PRP was detected. The colony median values of the PRP groups with an initial yeast concentration of  $10^3$  and  $10^4$  (PRP- $10^3$  and PRP- $10^4$ ) were found to be 3, 7, 34, 143, 500 and 19, 48, 166, 500, 500 for 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> hours, respectively. The colony median values of the PBS-(control) group with an initial yeast concentration of  $10^3$  for the same hours were 242, 280, 500, 500 and 500, respectively.

Compared with the PBS-control group, the PRP- $10^3$  showed that the antifungal activity was still going on at the 8<sup>th</sup> hour and disappeared at the 16<sup>th</sup> hour. The difference in colony production between the two groups at 8<sup>th</sup> hour was statistically significant ( $p < 0,05$ ). It was observed that the antifungal activity continued at the 4<sup>th</sup> hour, decreased at the 8<sup>th</sup> hour, and disappeared at the 16<sup>th</sup> hour



in the group PRP-10<sup>4</sup>. Although the same amount of PRP was used and the same amount of chemokine and kinocidins were released in both groups, the concentration of *C. albicans* was considered to be important in the detection of more effective PRP-10<sup>3</sup> group.

Although there was an increase in IL-8 levels by hours in the two PRP groups by ELISA method, no antifungal effect was detected against *C. albicans*. Test results of TMSB4 were detected 7-10 times higher in the PRP groups than in the PBS-control group due to the presence of intense platelet concentration. It was observed that decrease in TMSB4 values results from the antifungal activity on the advancing hours in the PRP groups. Whereas PF-4 did not act an antifungal activity on PRP-10<sup>3</sup> and PRP-10<sup>4</sup>.

It was considered that the use of fully automated systems to obtain highest platelet and leukocyte counts in PRP is important in order to be effective in *C. albicans* and other fungal infections. Even in our study group where the highest platelet counts were obtained at the lowest concentration, *C. albicans* reproduction could not completely eliminated as mentioned in the literature. Repeated doses of PRP applications, such as drugs used in patients, may have longer duration of action and even complete repression of reproductive outcomes. In addition, a large-scale project involving all chemokines, kinocidins, and other molecules thought to play a role in the antifungal activity of platelets is needed.

**Keywords:** *Candida albicans*, Antifungal resistance, Platelet Rich Plasma.

**Supporting Institutions:** This study is supported by University of Health Sciences, Scientific Research Projects Unit.

**Author:** Berksan ŞİMŞEK, MD

**Advisor:** Rıza Aytaç ÇETİNKAYA, Ass. Prof.

# İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	xi
TABLolar DİZİNİ .....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. <i>Candida albicans</i> .....	3
2.1.1. Tarihçesi ve Taksonomisi.....	3
2.1.2. Genel Mikrobiyolojik ve Metabolik Özellikleri.....	4
2.1.3. Epidemiyolojisi.....	5
2.1.4. Patogenezi ve Virülansı.....	6
2.1.4.1. Adezyon (konak hücre yüzeyine tutunma), Yüzey değişimi ve Hidrofobisite .....	7
2.1.4.2. Germ tüp – hif oluşumu (dimorfizm) .....	8
2.1.4.3. Toksinler.....	8
2.1.4.4. Enzimler .....	9
2.1.4.5. Fenotip değişimi .....	10
2.1.4.6. Hemolitik faktör .....	10
2.1.4.7. Slime faktör ve biyofilm oluşturma.....	10
2.1.5. Risk Faktörleri .....	11
2.1.6. Enfeksiyonları.....	12
2.1.6.1. Yüzeyel <i>Candida</i> enfeksiyonları .....	12
2.1.6.2. İnvaziv <i>Candida</i> enfeksiyonları.....	13
2.1.7. Tanısı .....	15
2.1.7.1. Mikroskopi .....	16

2.1.7.2. İzolasyon.....	17
2.1.7.3. Tiplendirme .....	18
2.1.8. Tedavi Seçenekleri .....	20
2.1.8.1. Poliyenler.....	20
2.1.8.2. Azoller .....	20
2.1.8.3. Ekinokandinler .....	21
2.1.8.4. Nükleik Asit Sentez İnhibitörleri.....	22
2.1.9. Antifungal Direnç .....	22
2.2. Trombositler.....	22
2.2.1. Giriş .....	22
2.2.2. Tarihçe .....	23
2.2.3 Trombositlerin Aktivasyonu.....	24
2.2.4. Trombositlerin Özellikleri .....	25
2.2.5. Trombositlerin Kemokin-Kinosidin Özellikleri .....	26
2.2.6. Trombositlerin Konak Hücre Savunmasındaki Rollerini .....	27
2.2.6.1. Amplifikasyon Basamakları .....	27
2.2.6.2. Trombosit Mikrobisidal Proteinleri (PMP) ve Kinosidinler (PK) .....	27
2.2.7. Diğer Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları.....	29
2.2.8. İmmun Yanıtın Güçlendirilmesinde Trombositlerin Rolü .....	30
2.2.9. Trombositlerin Çeşitli Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri.....	31
2.2.9.1. Bakteriyel Patojenler ile Trombositlerin Etkileşimleri.....	31
2.2.9.2. HIV-1 ile Trombositlerin Etkileşimi .....	33
2.2.9.3. Parazitler ile Trombositlerin Etkileşimi .....	33
2.2.9.4. Mantarlar ile Trombositlerin Etkileşimi .....	33
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	36
3.1. Kullanılan Cihazlar .....	36
3.2. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri.....	36
3.3. Kullanılan ELISA Kitleri.....	37
3.4. Örnek Kabulü.....	37
3.5. Çalışmaya Alınma Kriterleri.....	38
3.6. Yöntem.....	38
3.7. Trombositten Zengin Plazma (TZP).....	38

3.8. Otolog Trombin Elde Edilmesi.....	39
3.9. Çalışma Gruplarının Hazırlanması .....	40
3.10. Trombositten Zengin Plazma (TZP) Grubu.....	41
3.11. Kontrol (Phosphate buffered saline, PBS) Grubu.....	42
3.12. Kemokin, Kinosidinlerin ELISA Metodu ile Ölçülmesi .....	42
3.13. Üreme Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	43
3.14. İstatistiksel Analiz.....	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. Gönüllülere Ait Tam Kan Değerleri .....	45
4.2. TZP Değerleri .....	45
4.3. Gönüllülere Ait Tam Kan ve TZP Değerlerinin İstatistiksel Analizi .....	47
4.4. Koloni Sayımı.....	47
4.5. TZP ve Kontrol Gruplarında Üremelerin Karşılaştırılması .....	54
4.6. TZP ve Kontrol Grupları ile <i>C. albicans</i> Üremesi Arasındaki İlişkilerin İncelenmesi .....	56
4.7. TZP ve Kontrol Grupları Üreme Sonuçları ile ELISA Testlerinin Ölçümleri Arasındaki İlişkilerin İncelenmesi .....	56
4.7.1. Timosin-β4 (TMSB4) .....	56
4.7.2. Trombosit Faktör-4 (PF-4).....	58
4.7.3. İnterlökin-8 (IL-8).....	59
5. TARTIŞMA .....	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70
7. KAYNAKLAR .....	72
ÖZGEÇMİŞ .....	83
EKLER.....	92

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>A.B.D.</b>	:	Amerika Birleşik Devletleri
<b>ADP</b>	:	Adenozin Difosfat
<b>AIDS</b>	:	Acquired Immune Deficiency Syndrome Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu
<b>AMP</b>	:	Adenozin Monofosfat
<b>ATP</b>	:	Adenozin Trifosfat
<b>C</b>	:	Kemokin
<b>CC</b>	:	CC Kemokini
<b>CCL5</b>	:	T Lenfosit Hücrelerinin Ekspresyonu ve Salınımı (RANTES)
<b>CCR1</b>	:	CC Kemokin Reseptörü 1
<b>CCR3</b>	:	CC Kemokin Reseptörü 3
<b>CCR4</b>	:	CC Kemokin Reseptörü 4
<b>CD162</b>	:	P-selektin Glikoprotein Ligand 1 (PSGL-1)
<b>CR3</b>	:	Kompleman Reseptörü 3
<b>CXC</b>	:	CXC Kemokini
<b>CX<sub>3</sub>C</b>	:	CX <sub>3</sub> C Kemokini
<b>CXCL4</b>	:	Trombosit Faktör 4 (PF-4)
<b>CXCL7</b>	:	Trombosit Bağlayıcı Protein (PBP)
<b>CXCR4</b>	:	CXC Kemokin Reseptörü 4
<b>C3a</b>	:	Kompleman 3 a
<b>C5a</b>	:	Kompleman 5 a
<b>dk</b>	:	Dakika
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik Asit
<b>ELISA</b>	:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay Enzim Bağlantılı İmmünosorban Yöntem
<b>HIV</b>	:	Human Immunodeficiency Virus İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
<b>ICBN</b>	:	International Code of Botanical Nomenclature Uluslararası Botanik İsimlendirme Kodları
<b>IL-1</b>	:	İnterlökin 1
<b>IL-6</b>	:	İnterlökin 6

<b>IL-8</b>	:	İnterlökin 8
<b>kDa</b>	:	Kilodalton
<b>kob</b>	:	Koloni Oluşturan Birim
<b>ml</b>	:	Mililitre
<b>PBP</b>	:	Trombosit Bağlayıcı Protein (CXCL7)
<b>PBS</b>	:	Fosfatlı Tampon Solüsyonu
<b>PF-4</b>	:	Trombosit Faktör 4 (CXCL4)
<b>PK</b>	:	Kinosidin
<b>PMP</b>	:	Trombosit Mikrobisidal Proteinler
<b>PSGL-1</b>	:	P-selektin Glikoprotein Ligand 1 (CD162)
<b>P-PRP</b>	:	Pure-Platelet Rich Plasma, Saf-Trombositten Zengin Plazma
<b>RANTES</b>	:	T Lenfosit Hücrelerinin Ekspresyonu ve Salınımı (CCL5)
<b>SDA</b>	:	Sabouraud Dekstroz Agar
<b>sn</b>	:	Saniye
<b>TLR1</b>	:	Toll Benzeri Reseptör 1 (Toll Like Receptor 1)
<b>TLR2</b>	:	Toll Benzeri Reseptör 2 (Toll Like Receptor 2)
<b>TLR4</b>	:	Toll Benzeri Reseptör 4 (Toll Like Receptor 4)
<b>TLR6</b>	:	Toll Benzeri Reseptör 6 (Toll Like Receptor 6)
<b>TLR9</b>	:	Toll Benzeri Reseptör 9 (Toll Like Receptor 9)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	:	Tümör Nekrozis Faktör
<b>TZP</b>	:	Trombositten Zengin Plazma
<b>TZP-10<sup>3</sup></b>	:	Başlangıç Maya Konsantrasyonu 10 <sup>3</sup> kob/ml Olan Trombositten Zengin Plazma Grubu
<b>TZP-10<sup>4</sup></b>	:	Başlangıç Maya Konsantrasyonu 10 <sup>4</sup> kob/ml Olan Trombositten Zengin Plazma Grubu
<b>YBÜ</b>	:	Yoğun Bakım Üniteleri
<b><math>\alpha</math></b>	:	Alfa
<b><math>\delta</math></b>	:	Dense ??yoksa delta mı?
<b><math>\lambda</math></b>	:	Kappa – Lizozomal Granül
<b><math>\mu</math>l</b>	:	Mikrolitre
<b><math>\mu</math>m</b>	:	Mikrometre

## TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. Sık Rastlanan <i>Candida</i> Türlerinin Karbonhidrat Asimilasyon Özellikleri	5
3.1. Çalışma Grupları	41
4.1. Gönüllü Bağışçıların Tam Kan (TK) ve Trombosit Zengin Plazma (TZP) Değerleri	46
4.2. Gönüllü TK ve TZP Gruplarındaki Değerlerin Analizi	47
4.3. Üç Çalışma Grubuna Ait 18-24. Saat Sonunda SDA Plaklarında Üreyen Koloni Sayıları	48
4.4. 10 <sup>3</sup> Maya Konsantrasyonuna Sahip TZP ve PBS Gruplarında Üreyen Koloni Sayılarının Saatlere Göre Karşılaştırma İstatistikleri	54
4.5. TZP ve PBS Gruplarında Farklı Saatlerdeki Üreme Ortalamaları	55
4.6. TZP ve Kontrol Grupları ile <i>Candida albicans</i> Üremesi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi	56
4.7.A. TZP ve Kontrol Grupları Human TMSB4 Sonuçları	58
4.7.B. TZP ve Kontrol Grupları Human TMSB4 Sonuçlarının Grafiği	58
4.8.A. TZP ve Kontrol Grupları Human PF-4 Sonuçları	59
4.8.B. TZP ve Kontrol Grupları Human PF-4 Sonuçlarının Grafiği	59
4.9.A. TZP ve Kontrol Grupları Human IL-8 Sonuçları	61
4.9.B. TZP ve Kontrol Grupları Human IL-8 Sonuçlarının Grafiği	61

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Gram Boyama ile Gram Pozitif Boyanan Maya Hücreleri	16
2.2. Sabouraud Dekstoz Agar'da <i>C. albicans</i> Kolonileri	17
2.3. Germ Tüp Yapıları	18
2.4. <i>Candida albicans</i> 'a Ait Klamidospor Yapıları	18
2.5. Kromojenik Besiyerindeki Farklı <i>Candida</i> Türleri	19
3.1. MagellanPRP™ Tam Otomatize Trombosit Santrifüjü	39
3.2. Otolog Trombin Elde Edilme Basamakları	40
3.3. Otolog Trombin,-TZP/PBS (Kontrol Grubu) ve <i>C. albicans</i> Karışımının Etüvde Bekletilmesi ve Çalkalanması	42
3.4. Bir Gönüllüye Ait Her 3 Çalışma Grubunun SDA Plaklarında Ekim Zamanı ve Gruplandırılmaları	43
4.1. 1-9. Bağışçılara Ait İki Farklı TZP Grubunun <i>Candida albicans</i> Üzerine 1. Saat Etkinliğini Gösteren Koloni Sayım Plakları	49
4.2. 1-9. Bağışçılara Ait İki Farklı TZP Grubunun <i>Candida albicans</i> Üzerine 2. Saat Etkinliğini Gösteren Koloni Sayım Plakları	50
4.3. 1-9. Bağışçılara Ait İki Farklı TZP Grubunun <i>Candida albicans</i> Üzerine 4. Saat Etkinliğini Gösteren Koloni Sayım Plakları	51
4.4. 1-9. Bağışçılara Ait İki Farklı TZP Grubunun <i>Candida albicans</i> Üzerine 8. Saat Etkinliğini Gösteren Koloni Sayım Plakları	52
4.5. 1-9. Bağışçılara Ait İki Farklı TZP Grubunun <i>Candida albicans</i> Üzerine 16. Saat Etkinliğini Gösteren Koloni Sayım Plakları	53



# 1. GİRİŞ

Son dönemde tanı ve tedavi alanındaki gelişmelere eş olarak mantar enfeksiyonlarının sıklığında bir artış gözlenmektedir. Bağışıklık sistemi baskılanan hastalarda konak savunmasında meydana gelen değişiklikler çeşitli enfeksiyonlara duyarlılığı arttırırken, hastalıkların tanı ve tedavisi için yapılan girişimsel tıbbi işlemler, hastane enfeksiyonlarının gelişimini kolaylaştırmaktadır. Bununla ilişkili olarak fırsatçı mantar enfeksiyonu gelişimi yönünden risk grubuna giren hasta sayısı giderek artmaktadır (1).

Hastanelerdeki mantar enfeksiyonlarının (%80) büyük bir kısmından *Candida* türleri sorumludur (2). Mantar enfeksiyonlarında etken olarak en sık *Candida* türleri, özellikle de *C. albicans* saptanmaktadır. Yeni tedavi yaklaşımları, transplantasyon cerrahisinin gelişmesi, kemoterapi ve immünsüpresif tedavi alan hasta sayılarının artışı, yoğun bakım ünite (YBÜ)'lerinde yatan hasta sayılarında artış, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve hastalara uygulanan girişimsel işlemler nedeniyle *Candida* enfeksiyonlarının sıklığı giderek artmaktadır (3). Enfeksiyonların etkenleri değişiklik gösterse de son 20 yılda bildirilen enfeksiyonların %95'i *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* ile gerçekleşmiştir (4,5). Kandidemi ve kandidüri dışında invaziv *Candida* enfeksiyonlarının tanısını koymak genellikle zordur. Bu nedenle klinisyenler *Candida* enfeksiyonları yönünden risk faktörlerini çok iyi değerlendirmeli ve mevcut bilgiler doğrultusunda hareket etmelidirler (6).

*Candida* türleri memelilerin sindirim kanalı florasında, birçok bitkinin üzerinde, insanın mukozal yüzeyleri ve cildinde bulunduğu klinik örneklerde *Candida* türlerinin saptanması, kolonizasyon, kontaminasyon ya da gerçek hastalık etkeni olup olmadıklarının ayırımı gerektirmektedir (7,8).

Mantar enfeksiyonunun sıklığının ve buna bağlı mortalite ve morbidite oranlarının yükselmesi, ampirik antifungal kullanımının yaygınlaşmasına, dirençli mantar suşlarının ortaya çıkmasına ve direnç oranlarının artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle uygun ve etkin antifungal kullanımı çok önemlidir (9). Uygun antifungal

tedaviye ilaveten trombositten zengin plazma (TZP) uygulaması son yıllarda önem arz etmektedir.

Aktive edilen TZP buldukları ortama bir takım büyüme faktörleri salmaktadır. Bazı çalışmalarda bu büyüme faktörlerinin mikroorganizmaların çoğalmalarına yardımcı olabileceği belirtilmekle birlikte, baskı altına alınmış enfeksiyonlarda TZP'nin kullanılabileceği de belirtilmektedir.

Bu çalışmada standart bir *Candida* suşu (*C. albicans* ATCC 10231) üzerine, gönüllü bağışçılardan elde edilen TZP'nin in vitro etkinliği araştırılmıştır. Böylelikle TZP'nin bölgesel olarak uygulanması ile çeşitli *Candida* enfeksiyonlarında TZP'nin tek başına antifungal etkinliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Candida albicans*

#### 2.1.1. Tarihçesi ve Taksonomisi

Hippocrates ve Galen dönemlerinden beri (M.Ö.4.yy.) *Candida* cinsine ait ağızdaki pamukçuk lezyonları bilinmektedir. 1839 yılında Alman Bernard Langenbeck, tifüslü bir hastanın oral lezyonlarından izole ettiği organizmayı yanlışlıkla tifüs etkeni olarak tanımlamıştır. Pamukçuk etkeni olarak mantarın tarifi ise ilk kez Gruby tarafından 1842 yılında yapılmıştır (10). Diğer bir araştırmacı olan Robin ilerleyen yıllarda pamukçuk etkeninin sistemik enfeksiyonlara da neden olabileceğini gözlemlemiş ve etkene 1853 yılında *Oidium albicans* adını vermiştir (11,12). Bu tarihten sonra aynı mantar için önerilen isimlerin 100'ü aştığı görülmüş, 1923 yılında Berkhout psödohif geliştiren, askospor üretmeyen maya türlerini kapsayan mantarlar için *Candida* cins isminin kullanılmasını yeniden önermiş, daha sonra bu isim uluslararası alanda kabul görmüştür. Klinik yönden değerlendirildiğinde 1849'da Wilkinson ilk vajina kandidozunu tanımlarken, 1861'de Zenker ilk sistemik kandidoz olgusunu bildirmiştir. Bu tarihlerden günümüze kadar da farklı araştırmacılar tarafından cilt, cilt altı, sistemik ve merkezi sinir sistemi kandidozları bildirilmeye devam etmiş, antimikrobiyal ajanların kullanımının yaygınlaştığı 1940'lı yıllardan itibaren ise *Candida* enfeksiyonlarının sıklığının artmasına paralel olarak, konuyla ilgili gelişmeler hız kazanmıştır (10,11,13).

Maya taksonomisine ait kurallar uluslararası botanik isimlendirme kodları (International Code of Botanical Nomenclature-ICBN) tarafından düzenlenmekte olup, eşeyli sporlar ve bunların üretiliş biçimleri mantarların sınıflandırılmasında temel oluşturmaktadır (14,15). *C. albicans*; Eumycota aleminin, Ascomycota bölümüne, Hemiascomycetes sınıfına, Saccharomycetales takımına ait Candidaceae ailesinin *Candida* cinsi içinde bulunmaktadır (15,16).

Bu cins içerisinde 200'e yakın tür olduğu düşünülmektedir. *Candida albicans* en sık soyutlanan tür olmakla birlikte *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*,

*Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida kefyr*, *Candida dubliniensis* sıklıkla saptanan türlerdir (14-17).

### 2.1.2. Genel Mikrobiyolojik ve Metabolik Özellikleri

*Candida* türleri ince duvarlı, oval, kapsülsüz, hareketsiz, Gram-pozitif, 1-3 x 4-6 µm boyutlarında, lateral tomurcuklanma (blastospor) ile aseksüel olarak üreyen fakültatif anaerob mayalardır. Maya formu dışında, kültür ve dokularda yalancı hif veya gerçek hif oluşturabilirler. Yalancı hifler tomurcuklanma sırasında meydana gelen uzantının ana hücreden ayrılmaması sonucu gelişir. Yeni hücre ana hücreye bağlı kalarak uzar ve filamentöz bir yapı oluşturur. Gerçek hifler ise maya hücresinden veya hifin bir dalından oluşabilir; boğumlanma göstermez, apikal uzantı tarzında, bölmeli ve düzgün kenarlıdır (17,18). Türlerin çoğu yalancı hif oluşturur. *Candida albicans* ve çok seyrek izole edilen *Candida dubliniensis* ve *Candida norvegensis* türleri gerçek hif oluşturma özelliğine sahiptir.

*Candida* türleri Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) ve kanlı agarda, oda ısısında (22-26°C'de) ve 37°C'de kolayca üreyebilirler. Oda ısısında ve SDA besiyerinde 24-48 saatte krem renkli, opak, düzgün yüzeyli, 1-2 mm çapta, tipik maya kokusu olan, S tipi koloniler oluştururlar. *C. albicans* kanlı agarda kenarlarında yıldızimsı uzantıları olan koloniler oluşturur (17,19). Türler arasında morfolojik farklılıklar ancak mısır unlu agar gibi özel besiyerlerindeki üreme özelliklerine göre saptanabilir.

Klamidosporlar *C. albicans*'ın en belirgin özelliğidir ancak *C. dubliniensis* ve *C. tropicalis*'in bazı kökenleri de klamidospor oluşturmaktadır. Ayrıca *C. tropicalis* tekrarlayan pasajlarda klamidospor oluşturma özelliğini kaybederken *C. albicans*'da bu özellik değişmez (20,21).

*C. albicans*'ı diğer *Candida*'lardan ayırt etmek için kullanılan diğer bir test çimlenme borusu (germ tüp) testidir. Bu testte konak koşulları taklit edilerek 37°C'de, nötral pH ve serum varlığında hif oluşumu uyarılmaktadır. *C. albicans*'ın maya hücreleri belirtilen koşullarda ve 2 saat içinde fasülye filizini andıran çimlenme borusu oluştururlar. Bu testin değerlendirme aşamasında dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta çimlenme borusunun, çıktığı maya hücresinden boğumlanma olmadan çıkmasıdır (20,22).

Neticede türlerin tanımlanmasında klamidospore ve çimlenme borusu oluşturma özelliği, mısır unu-Tween 80 agarda morfolojisi, psödohiplerin görünümü ve blastokonidyumların bunlara bağlanma şekli, çeşitli karbonhidratlara karşı oluşan asimilasyon ve daha seyrek olarak fermentasyon özellikleri ve moleküler yöntemlerden yararlanılabilir (15). Sık rastlanan *Candida* türlerinden bazılarının karbonhidrat asimilasyon özellikleri Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1.** Sık Rastlanan *Candida* Türlerinin Karbonhidrat Asimilasyon Özellikleri (15).

Türler	Glikoz	Maltoz	Sükroz	Trehaloz	Galaktoz	Ksiloz	Rafinoz	Laktoz
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. kefyr</i>	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	+	-	-	-	-

### 2.1.3. Epidemiyolojisi

Mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığı 1980'lerden sonra artış göstermiş olup, bu artışın sebepleri arasında son yıllarda tıptaki gelişmelerin sonucunda başta kanser hastalarının, kemik iliği ve organ nakli yapılan hastaların, yoğun bakım ünitelerinde takip edilen çocuk ve erişkin hastaların yaşam sürelerinin uzaması gibi etkenler gösterilebilir. Ayrıca özellikle gelişmiş ülkelerde kronik hastalığı olan ileri yaşlı nüfusunun artması gibi değişen demografik özellikler ve AIDS (Akkiz İmmün Yetmezlik Sendromu, Acquired Immune Deficiency Syndrome) pandemisi mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığını arttıran diğer nedenlerdir (23,24).

Mantar türleri içinde hastalardan halen en sık izole edilen tür *Candida albicans* 'tır. Mukoza enfeksiyonlarının %90-100'ü ve kandidemilerin %50-70'inden sorumludur. *Candida* türlerine bağlı gelişen invaziv enfeksiyonlar çoğunlukla hastanın kendi florasında kolonize olan *Candida* türleri ile oluşmaktadır (25,26). İnsan gastrointestinal sisteminden en sık izole edilen türler *Candida albicans* (%50-70), *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* ve *Candida glabrata* 'dır (15).

Patojen mayalar arasında *Candida* spp. en yaygın tanımlanan türdür; geniş spektrumlu antibiyotik kullanımındaki artış, immünsüpresif ilaçların kullanımı ve

yaşlanan nüfus ile birlikte *Candida* türlerinin nozokomiyal patojenler arasındaki önemi artmaktadır. Bu türler Amerika Birleşik Devletlerinde (A.B.D.) hastane kökenli kan dolaşımı enfeksiyonlarının en sık dördüncü ve YBÜ'lerdeki kan dolaşımı enfeksiyonlarının en sık üçüncü nedenidir (27).

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarındaki artışın sebepleri solid organ ve kemik iliği transplantasyonu, kanser hastalığı, kemoterapi uygulamaları ile immün yetmezlikli hasta popülasyonunun, konağın doğal bariyerlerini bozan invaziv işlemlerin ve *Candida* türlerinin kolonizasyonunu arttıran geniş spektrumlu antimikrobiyal ilaçların kullanımının giderek artması olarak sıralanabilir (28,29). Ülkemizde kandidemilerde *C. albicans* izolasyon oranı %32-65 arasında değişmektedir (23).

Günümüzde mantar enfeksiyonlarının giderek önem kazanması beraberinde etkenin tür düzeyinde tanımlanması, epidemiyolojik tiplendirilmesi, salgınların izlenmesi ve antifungal ilaçlara karşı oluşabilecek direncin saptanmasına yönelik çalışmaların yapılmasını zorunlu hale getirmiştir (30). Bu amaçla SCOPE (Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance), NEMIS (National Epidemiology of Mycoses Study), SENTRY (Antimicrobial Resistance Surveillance Program) ve ARTEMİS (Global Antifungal Susceptibility Program) gibi çeşitli izleme programları içinde *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal direnç özellikleri hakkında yararlı veriler toplanmıştır. Ancak bu veriler belirli merkezlerden elde edildiğinden hastalığın görülme sıklığı hakkında net bir bilgi vermezler. Bu nedenle daha sağlıklı veri elde edebilmek için popülasyona dayalı izlem yapılması önerilmektedir (2,31).

*Candida*'ların tiplendirilmesinde çeşitli fenotipik ve genotipik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda deoksiribonükleik asit (DNA) temelli yöntemlerin *Candida*'lar ile ilgili epidemiyolojik çalışmalarda başarı ile kullanılabilceği bildirilmiştir (30).

#### **2.1.4. Patogenezi ve Virülansı**

*Candida albicans* hücreleri ve memeli konak dokuları arasındaki etkileşimler oldukça karmaşıktır. Floradaki mantarlar genellikle önce sayıları artarak kolonizasyon ve daha sonra buna bağlı olarak enfeksiyon meydana getirirler. İlk olarak, kolonizasyonu başlatmak için bir epitel yüzeye adezyon gereklidir. Yüzeysel

mikozlarda, deri veya mukozanın bütünlüğünün bozulduğu yerlerden yalancı hifleri ile doku içine giren *Candida* 'lar tomurcuklanarak oluşturduğu blastokonidyumlarıyla dokuya yayılır. Enfeksiyon süreci çoğu olguda yüzeysel kandidoz olarak sonuçlanan epitelyal yüzeylerin içine penetrasyon sonrası bitmektedir. Derin veya sistemik mikozlarda ise genellikle önce gastrointestinal sistem kolonizasyonu meydana gelir, sonra mukozayı geçerek kana ulaşılır. Bunun için endotel yüzeylere penetre olup dokulara ulaşması gerekir. Fagositik etkinlik yetersizse hemen hemen her organ ve sisteme yerleşebilir. Mantarlar dolaşım sistemine ulaştıklarında oradaki hücrel savunma sistemi ile yüzleşmek zorundadırlar (28,32). Dermis ya da kan dolaşımına geçen *Candida* türlerine karşı polimorfonükleer lökositler savunmaya katılırlar. Monosit ve eozinofiller fagositozda rol alırlar. Ayrıca *Candida* türlerini doku makrofajları ve retiküloendotel hücreler de öldürebilirler (33). Fagositlerin *Candida* türlerini öldürmelerindeki başlıca mekanizmalar; myeloperoksidaz, hidrojen peroksit ve süperoksit anyon sistemleri olup kimotripsin benzeri katyonik proteinler üretilip membran geçirgenliğini artırarak da etki ederler. Isıya duyarlı ve dirençli opsoninler de *Candida* türlerinin fagositozunu kolaylaştırırlar (33,34).

Floradaki bakteriler, *Candida* türlerinin çoğalmasını besin maddelerini hızla tüketip toksik maddeler üreterek engellerler (35). *Candida* türlerine karşı humoral ve hücrel bağışıklık gelişir, fakat hücrel bağışıklığın rolü daha fazladır. Yüzeysel deri enfeksiyonlarında hücrel bağışıklığın, sistemik enfeksiyonlarda ise doğal direncin yanında humoral bağışıklığın öne çıktığı söylenebilir (28,36).

*Candida* enfeksiyonlarının patogeneziindeki majör virülans faktörleri konak epitel ve endotel hücrelerine adezyon, germ tüp oluşumu ve proteinaz üretimidir. Ayrıca fosfolipaz sekresyonu, toksin üretimi, fenotip değişimi, hücre duvarı ve yüzey değişimi, hidrofobisite gibi faktörler de virülans ve patogenezi de rol almaktadır (37).

#### **2.1.4.1. Adezyon (konak hücre yüzeyine tutunma), Yüzey Değişimi ve Hidrofobisite**

Maya hücre duvarının virülanstaki en önemli rolü, adezyon basamağında olmaktadır (38). *Candida* türlerinin mukozal epitel hücrelerine veya endotel hücrelerine bağlanması, kandidozun ortaya çıkmasında önemli bir adımdır. Yapılan moleküler çalışmalarda, epitele ve endotele bağlanmada rol alan ligandın *C. albicans*'ın yüzeyindeki hücre duvarı moleküllerinden mannoprotein olduğu

anlaşılmıştır (39). Bu mannoptein epitele yapışarak invazyonda önemli rol oynar (40). Antijen olarak konağa sunulan mannoptein immunomodülatör etkilidir. *C. albicans*'ın germ tüp oluşumu döneminde hücre yüzey hidrofobisitesi değişir, plastik yüzeylere ve epitele bağlanma yeteneği artar (41). Diğer yüzey karbonhidrat yapıları olan beta glukoz ve kitine karşılık; konakta bunların bağlanabileceği fukoz, N-asetilglukozamin ve siyalik asit bulunur (42). *C. albicans* tutunma özelliği en fazla olan türdür (43). *C. albicans* yüzey özelliklerine göre iki gruba ayrılır. Karbon kaynağı olarak yüksek konsantrasyonda şeker (özellikle galaktoz) içeren ortamda üreyen *C. albicans* kökenlerinin yüzey kompozisyonunu değiştirebildiği, epitele daha iyi bağlandığı ve daha virülan olduğu gösterilmiştir. Karbonhidrattan zengin diyetle beslenen bireylerde oral kandidoz gelişimi bu şekilde açıklanabilir. İkinci grup, yüzeyini değiştirme özelliğini kaybetmiştir ve patojenik potansiyelleri çok düşüktür (34,44,45).

#### **2.1.4.2. Germ tüp - hif oluşumu (dimorfizm)**

*Candida albicans*'ın enfekte dokuda hem maya hem hif formu bulunmasına rağmen, aktif semptomatik enfeksiyonu ile hif formu ilişkilidir. Hif şeklinin maya şekline göre dokuya elli kez daha fazla yapışması ve plastik yüzeylere tutunmayı sağlayan fibriler bir tabaka oluşturması *Candida* türlerinin patogeneze ve virülanstaki rolünü göstermektedir. Tomurcuklu hücreden germ tüpe geçişte hücre yüzey bileşiminde değişiklikler meydana gelir ve çeşitli adezinler oluşur (37,46,47). Nötrofiller *C. albicans* blastosporlarını germ tüp ve uzun hiflere göre daha iyi fagosite eder (42). Bazı araştırmacılar, enfeksiyon geliştirebilme açısından iki şeklin de patojenite de önemli olduğunu vurgulamışlardır. Dimorfizmin biyofilm oluşumundaki önemini incelemek için yapılan bir çalışmada, maya formunun (iç tabaka) yüzeye yapışmada önemli olduğu, hif formunun (dış tabaka) da kalınlık sağladığı bildirilmiştir (43).

#### **2.1.4.3. Toksinler**

İlk defa Henrici tarafından *C. albicans*'da endotoksin benzeri toksin bulunduğu gösterilmiştir. Toksin üretimi, yüksek moleküler ağırlıklı toksinler ve düşük moleküler ağırlıklı toksinler olarak 2 grupta incelenir. Glikoprotein yapıdaki toksinler ve kandidotoksin yüksek molekül ağırlıklıdır. Sistemik kandidozlu hastalarda görülen klinik belirtilerin çoğu zaman Gram negatif bakteri sepsislerinden ayırt



edilememesi, *Candida* toksinlerinin patogenezdaki rolüne kanıt olabilir. Ancak bakteri toksinleri ile potens açısından yarışamazlar. Bunun başlıca sebebi de mayanın konakçı ile kommensal ilişki kurmasıdır. Ayrıca kandid toksin üreten bir *C. albicans* kökeninde düşük molekül ağırlıklı toksinler saptanmış bunların da altı çeşidinin olduğu gösterilmiştir (38,45).

#### **2.1.4.4. Enzimler**

Konakçı dokuya yayılmak için mikroorganizmalar hidrolitik enzimler üretirler. Lipid ve proteinden oluşan konakçı hücre membranı bu enzimlerin hedefidir. *C. albicans* için 14 tanımlı enzimden 2 tanesi patojenite de rol oynamaktadır. Bunlar proteinaz ve fosfolipaz enzimleridir (48).

*Candida albicans*'ın hücre dışı proteolitik aktivitesinden izolata ve çevre koşullarına bağlı olarak eksprese ettiği bir enzim ailesi olan aspartil proteaz enzimleri sorumludur. Farklı çalışmalar neticesinde kandidoz patogenezinde bu proteinlerin önemli bir rol oynadığı ortaya konmuştur. Sadece *C. albicans*'ta 10 farklı proteinaz geni gösterilmiş olup bununla birlikte diğer *Candida* türlerinde de homolog genler tanımlanmıştır (49). Aspartil proteaz enzimleri *in vivo* enfeksiyon sırasında patojenik *Candida* türleri tarafından salgılanır. *C. albicans*'ın laboratuvar izolatları ve klinik izolatlarının her ikisinde üretilen proteaz düzeyi ile virülans arasında bir ilişki vardır. Dolayısıyla proteinaz üretimi, mantar hücrelerinin hem konak dokuya penetrasyon ve kolonizasyonunu hem de konak bağışıklık sisteminden kaçma yeteneğini artırır. Bu enzimler immünglobulin ve kompleman gibi konak savunma proteinlerinde azalmaya sebep olabilirler. Aspartil proteaz genlerinde eksiklik bulunan genetiği değiştirilmiş izolatlar yaygın kandidozu olan hayvan modelinde düşük bir virülans göstermiştir (28). Ray ve Payne'nin yaptığı bir çalışmada, proteolitik olan ve proteolitik olmayan proteinaz kökenlerinin farelerdeki öldürücü etkileri arasındaki fark incelenmiş ve proteolitik olan kökenlerin diğerlerine oranla daha öldürücü olduğu gösterilmiştir (50). *C. albicans* türlerinde, proteinaz üretimi ile konak dokuya tutunabilme yeteneği arasındaki korelasyon çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Ghannoum ve Elteen yaptıkları çalışmada, yüksek proteolitik aktivite gösteren *C. albicans* kökenlerinin insan yanak epitel hücrelerine kolayca tutunabildiklerini, *C. albicans* kökenleri ile yaptıkları diğer bir çalışmalarında ise; yüksek proteolitik

aktivite gösteren kökenlerin yüksek tutunma değerlerine sahip olduğunu göstermişlerdir (51).

*Candida albicans* hücreleri lizofosfolipazın yanısıra fosfolipaz A, B ve C ile lizofosfolipaz transasetilaz aktivitesi göstermektedir. Fosfolipaz aktiviteleri olası virülans faktörü olarak kabul edilmektedir. Çünkü bu enzimler konak hücre membran hasarı, tutunma ve penetrasyonu ile ilişkilendirilmişlerdir. *C. albicans*'ın hücre duvarı diğer hücre duvarı bileşenlerinin kovalent bağlanmasını sağlayan dallı  $\beta$ -1,3 glukandan oluşan iskelet yapısına sahiptir. Ayrıca farklı hücre duvarı mannopteinleri arasında disülfid köprüleri şeklinde kovalent bağları da mevcuttur ve bazı mannopteinler kitine bağlanmıştır. Dolayısıyla *C. albicans* izolatları tarafından fosfolipaz üretimi fare modelinde virülans ve epitelyal hücrelere adezyon ile sonuçlanır (28).

#### **2.1.4.5. Fenotip Değişimi**

*Candida albicans* suşlarından bazıları fenotipik değişim sayesinde özgül besiyerinde farklı görünümde koloniler meydana getirirler. Bir çalışmada invaziv enfeksiyona sebep olanların, kommensal kökenlere nazaran daha sık fenotipik değişiklik yaptığı ve invazyon için optimal fenotipi seçtiği sonucuna varılmıştır (52).

Fenotip farklılığı, nötrofillerin kandidasidal aktivitelerine duyarlılıklarında, mayaların epitel hücrelerine tutunmasında, proteinaz salgılamalarında, hidrofobisitelerinde değişikliğe neden olmaktadır (53).

#### **2.1.4.6. Hemolitik Faktör**

*Candida albicans* glukozdan zengin kanlı agardaki kültüründe hemolitik aktivite sergiler. Bu hemolitik aktivite mannoptein ile ilişkilendirilmekte ve konak eritrositin parçalanmasından sonra serbest kalan hemoglobinden demir eldesine olanak sağladığı için olası bir virülans faktörü olarak kabul edilmektedir. Bu durum *C. albicans*'ın konak serumunda yaşayabilmesine katkı sağlamaktadır (28).

#### **2.1.4.7. Slime faktör ve biyofilm oluşturma**

Slime *Candida* türleri tarafından da oluşturulan; mikroorganizmanın plastik yüzeylere yapışması ve prostetik materyallere kolonizasyonunda görevli olan visköz, ekstraselüler bir maddedir (54). Tıbbi gereçlerin implantasyonu ile birlikte; tükürük, mukus, serum veya kan gibi vücut sıvılarındaki çeşitli makromoleküller (fibrinojen, fibronektin, kollajen ve laminin gibi) yüzey üzerinde birikerek hazırlayıcı bir film

tabaka oluştururlar. Mikroorganizmalar genellikle bu film tabakasına tutunurlar. İlk adezyon geri dönüşümlü ve gevşek olup ekzopolimer üretimi ile sıkı bir tutunmaya dönüşür. Ekzopolimerler, makromoleküllerin oluşturduğu katmanı saran slime (glikokaliks) tabakasını oluşturur. Çoğalan mikroorganizmalar slime tabakası içinde ekstraselüler matriks salgılamaya devam ederek kalın bir biyofilm tabakasına yol açarlar (45). *Candida* türlerinin sıklığı nozokomiyal enfeksiyon etkenleri arasında artmaktadır ve çoğunlukla bu enfeksiyonlardan implante gereçler sorumlu olup gerecin yüzeyinde biyofilm saptanmaktadır. Farklı *Candida* türlerinin, hatta farklı *C. albicans* suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri de farklılık göstermektedir. Ortamdaki artmış glukoz miktarı biyofilm oluşumunu hızlandırmaktadır. Hafif akımın olduğu ortamlarda (dolaşım ve üriner sistem gibi) statik ortamlara göre biyofilm oluşumu daha fazladır. Yüzeyin kimyasal yapısı da biyofilm oluşum hızını etkilemektedir ve polivinilklorüre oranla lateks yüzeylerde daha fazla biyofilm görülürken, poliüretan ve %100 silikonda ise azalmış olarak saptanmıştır (55). Biyofilm, mikroorganizmanın implante gereçlere yapışıp çoğalarak, sürekli bir enfeksiyon kaynağı olmasına sebep olur. Biyofilm tabakasının mikroorganizmayı opsonizasyon, fagositoz ve kemotaksis gibi vücudun savunma mekanizmalarından koruduğu bildirilmiştir (56). En önemli özelliklerinden biri de antifungal ajanlara direnç gelişimine sebep olmasıdır (55).

#### **2.1.5. Risk Faktörleri**

*Candida* türleri hafif yüzeyel enfeksiyondan, ağır sistemik enfeksiyona kadar çeşitli klinik tablolara yol açabilirler. Normal flora içeren bölgelerde fizyolojik koşulların değişmesi, mukokutanöz bariyerin ihlali, hormonal dengenin bozulması, immün sistemi baskılayan ilaçların kullanılması, kanser veya AIDS gibi immün yetmezliğe yol açan hastalıklar *Candida* enfeksiyonlarının ortaya çıkışını kolaylaştırmaktadırlar (33,35). Ayrıca kanıtlanmış organ tutulumu olmaksızın bir ya da daha fazla kan kültüründe herhangi bir *Candida* türünün izole edilmesine kandidemi denilmektedir. Özellikle YBÜ'lerinde yatan hastalara yapılan girişimlerden dolayı karşılaşılan bir formdur. Yapılan çalışmalar sonucu kan kültürlerinden izole edilen *Candida*'ların ciddi önem arz ettiğini ve oranlarının giderek arttığını göstermektedir. Kandidemi gelişimdeki risk faktörleri; Kemoterapi, nötropeni, radyoterapi, böbrek yetmezliği/diyaliz, üriner katater, özellikle abdominal

cerrahi işlemler, malign hastalıklar, diyabetes mellitus (DM), santral venöz katater (SVK), immunsupresif tedavi, enteral veya parenteral beslenme, YBÜ’de 7 günden fazla kalma, yaş ve yanıklar olarak sıralanabilmektedir (57,58).

### **2.1.6. Enfeksiyonları**

*Candida*’lar genel anlamda değerlendirildiğinde mukozal kolonizasyondan, çoklu organ tutulumuna kadar geniş bir yelpazede yer alan çok çeşitli enfeksiyonlara yol açabilirler. Temel olarak iki ana grupta enfeksiyonları incelemek mümkündür; yüzeysel ve invaziv *Candida* enfeksiyonları.

#### **2.1.6.1. Yüzeysel *Candida* enfeksiyonları**

##### **Kandidoz**

Genellikle *C. albicans*’ın etken olarak saptandığı kandidoz derinin yüzeysel mantar enfeksiyonudur. En sık etkilenen bölgeler derinin kıvrım yerleri olan katlantı bölgeleri olup, nemli ve kapalı alanlar diğer etkilenen yerlerdir (59). Cilt, saçlı deri, parmaklar, tırnaklar, ağız, boğaz, vajina, bronşlar ve gastrointestinal sistem tutulabilir. Sağlıklı bireylerde epitelyal bariyer fonksiyonlarının bozulmasına bağlı olarak gelişen kutanöz kandidoz tüm yaş gruplarında görülebilirken özellikle yenidoğan ve yaşlılarda daha sık görülür. Genellikle tedaviye yanıtın iyi olduğu bu enfeksiyonlar yüzeysel yerleşimlidir. Altta yatan predispozan durumu olan hastalarda ise sistemik kandidoz gelişebilir (60).

##### **Primer kutanöz kandidozlar**

Katlantı yerlerinden en sık tutulanları parmak araları, gluteal kıvrımlar, aksilla, kasık ve perianal bölgelerdir. Tutulan alanlar nemli ve kırmızı olup, parmak aralarında maserasyon bulunur. Benzer şekilde sıklıkla bebeklerde görülen bez kaynaklı dermatitlerde de bezin düzenli olarak değiştirilmemesi sonucu kronik nem ve idrar irritasyonuna bağlı olarak ciltte erozyonlar ve püstüllerin eşlik ettiği eritematöz lezyonlar bulunmaktadır. En sık rastlanan etken *C. albicans*’tır (59,60).

##### **Oral kandidoz**

Bağışıklık sisteminde ciddi bozukluk olan hastalarda sıklıkla görülmekle birlikte, yenidoğan ve yaşlılarda sağlıklı yetişkinlere oranla daha sık görülmektedir. Ayrıca geniş spektrumlu antibiyotik, steroid ve sitotoksik ilaç kullanımı, radyasyon tedavisi diğer tetikleyici faktörlerdir. Hastaların yanak mukozası ve ağız içinde süt keşiği görünümünde beyaz plaklar oluşur. Lezyondan alınan kazıntı örneklerinin

potasyum hidroksit (KOH) ile hazırlanan preparatlarının incelenmesinde psödohif ve blastosporların görülmesi tanıyı destekler (59,60). Oral kandidozun en sık rastlanan etkeni *C. albicans* olup bunu daha seyrek olarak diğer türlerde izlemektedir (21).

### **Vulvovajinal kandidoz**

Vulvada eritem, ödem, kaşıntı, yanma ve beyaz krem renkli peynir kesigi görünümünde akıntının eşlik ettiği bu klinik durumda en sık etken olarak *C. albicans* izole edilir. Geniş spektrumlu antibiyotik ve steroid kullanımı, gebelik, DM, sıkı ve sentetik iç çamaşırı kullanılması hastalığın gelişmesine katkıda bulunan risk faktörleridir (60).

### **2.1.6.2. İnvaziv *Candida* enfeksiyonları**

#### **Kandidemi**

Klinik olarak enfeksiyon bulgu ve belirtileri gözlenen hastanın en az bir kan kültüründe bir *Candida* türünün izole edilmesi kandidemi olarak tanımlanmaktadır (61). Kandidemiler invaziv *Candida* enfeksiyonlarının yaklaşık %50-70'ini oluşturmakta ve yüksek mortalite oranları nedeniyle mutlaka tedavi edilmelidirler. Kandidemi saptanan olguların çoğu YBÜ'nde takip edilen hastalardır. Bu nedenle YBÜ'nde yatış süresi tanımlanmış risk faktörleri arasında en önemlilerin biri haline gelmektedir (62). Kandidemi için yapılan bir risk belirleme çalışmasında; kanser hastaları, DM'si olanlar ve SVK kullanılan hastaların kandidemi yönünden daha yüksek riske sahip olduğu belirlenmiştir (63).

#### **Yaygın (Dissemine) Kandidoz**

Dissemine enfeksiyonun hematojen yolla geliştiğinin göstergesi olarak birbirine komşu olmayan iki organda *Candida* enfeksiyonu varlığının saptanması ile gösterilebilir. Uzun süre nötropenik kalan hastalarda (akut lösemi, aplastik anemi) daha sık gelişen kronik dissemine kandidoz, geniş etkili antibiyotik tedavisi uygulanmasına rağmen ateşin en az iki hafta süreyle devam ettiği ya da nötropeni düzeldikten sonra ateşin başladığı hastalarda akılda tutulması gereken bir klinik tablodur. Nötropenik bireylerde, en az üç gün süreyle uygulanan geniş etkili antibiyotik tedavisine rağmen ateşin devam etmesi, iki veya daha fazla vücut bölgesinde *Candida*'nın izole edilmesi ve ateşi açıklayacak başka bir odak bulunamaması durumunda akut dissemine enfeksiyonun varlığından söz edilebilir (61). Ateş yüksekliğine rağmen organ tutulumu yoktur. Bununla beraber karaciğer ve

dalak büyüyebilir, alkalen fosfataz genellikle çok yüksek seyreder. Karakteristik bulgu hedef lezyon (Bull's eye) olarak da bilinen, radyolojik görüntülemeye karaciğer ve/veya dalakta küçük, periferik yerleşimli lezyonların görülmesidir (61).

### **Üriner Sistem Enfeksiyonları**

Son yıllarda mantarların etken olduğu üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE)'nde artış gözlenmekte olup altta yatan ciddi rahatsızlığı olan hastalarda önemli bir risk oluşturmaktadırlar. Toplum kökenli ÜSE'lerde sık olarak izole edilmezken hastane kökenli ÜSE'lerde %10-30 oranında etken olabilirler. Özellikle üriner kateteri, üriner sistemde obstrüksiyonu olan, DM'li hastalarda asendan ÜSE'lerin en sık etkenleri *Candida* türleri olup %50-70'ini *C. albicans* oluşturmaktadır. Çeşitli faktörlere bağlı olarak tür dağılımı değişebilmekle birlikte diğer türlerde etken olabilmektedirler. *Candida*'lar üretra ve dış genital organların florasında bulunabildiklerinden, sağlam konakta ya da altta yatan predispozan bir nedeni olmayan hastalarda ortaya çıkan kandidüriler klinik olarak anlamlı kabul edilmemektedir. Klinik olarak en yaygın gözlenen durum asemptomatik üriner sistem kolonizasyonu olup sistit, piyelonefrit veya kandideminin eşlik ettiği sepsise kadar değişkenlik gösteren kliniğe yol açabilirler. Mantarlara bağlı gelişen ÜSE'de tanı kriterleri tam olarak tanımlanamamıştır. Tanı için öncelikle ilk basamak idrar kültürü tekrar edilmelidir. Tekrarlayan üreme izole edilen etkeni doğrularken, üremenin olmaması kontaminasyon lehine düşündürür. Tekrarlanan ikinci kültürde de üreme var ancak hasta asemptomatik ise predispozan faktörler gözden geçirilmeli, üriner kateter çıkarılmalı, antibiyotik tedavisi sonlandırılmalıdır. İdrarda maya üremesinin sebatı halinde ultrasonografik olarak üriner sistem obstrüksiyonunun varlığı araştırılmalıdır. Obstrüksiyon saptanmıyor ve hasta asemptomatik ise muhtemelen bu durum kolonizasyona bağlıdır ve tedavi önerilmemektedir (64,65).

Kandidürinin tedavisi için The Infectious Diseases Society of America (IDSA)'nın 2004 yılında yayınladığı kılavuzunda hastaların çoğuna tedavi gerekmediği belirtilmiştir. Yine kılavuzda semptomatik alt veya üst ÜSE'si olan hastaların tedavi edilmesi, asemptomatik hastalarda ise kandidemi gelişimi için yüksek riskli grupta olan bireylerde gelişen kandidürilerin tedavi edilmesi önerilmektedir. Kılavuzda yer alan asemptomatik kandidürinin tedavi edilmesi önerilen hasta grubunu nötropenik, düşük doğum ağırlıklı bebekler, ürolojik işlem

yapılacak hastalar, renal transplant alıcıları oluşturmaktadır. Çünkü bu hasta grubunda oluşan kandidüri, dissemine kandidozun bir göstergesi olabilir (66).

### ***Candida* Özofajiti**

Özellikle AIDS'li hastalarda oral kandidozla birlikte görülebilirken tek başına da bir bulgu olarak ortaya çıkabilir (21). Hastada, ağrılı yutkunma, yutmada zorluk ve retrosternal ağrı gibi semptomlar bulunur ve endoskopi eşliğinde alınan biyopsi örneğinin incelenmesi ile tanı konulur (67).

### **Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları**

Mantarların etken olduğu santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonları ciddi mortalite sebebi olup, *Candida*'lar en sık akut menenjit ve beyin apsesi olgularında etken olarak izole edilirler. Özellikle hematolojik malignite, solid organ transplantasyonu, kortikosteroid kullanımı, travma gibi risk faktörlerinin varlığı SSS'ye yayılım ya da direkt temas sonrası hastalık tablosunun gelişmesi için kolaylaştırıcı faktörlerdir (68).

### **Pulmoner Kandidoz**

Nötropenik ve YBÜ'de tedavi gören hastalarda daha sık görülmekle birlikte nadir rastlanılır. Genellikle hematojen yayılım sonucunda ya da kolonize olmuş orofarengeyal, mide içeriğinin aspirasyonuna bağlı gelişir. En sık etkenler *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* ve *C. lusitaniae*'dir. Klinik olarak hastalarda ateş, takipne, PA akciğer grafisinde difüz nodüler infiltrasyonlar gözlenir. Bronko alveoler lavaj (BAL) kültürü ve mikroskopik inceleme kolonizasyon ve enfeksiyonu ayırt ettiremez. Kesin tanı akciğer dokusunun histopatolojik incelemesi ile konur (69).

Bu enfeksiyonlardan başka gözde keratit ve endoftalmit, iskelet sisteminde de osteomyelit ve artrit gibi invaziv enfeksiyonlara da yol açabilirler.

### **2.1.7. Tanısı**

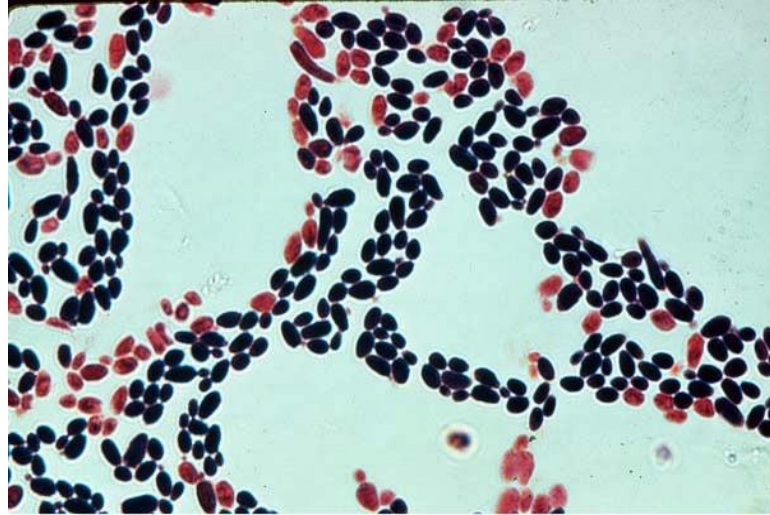
Mantar enfeksiyonlarının doğru laboratuvar tanısında *Candida*'larda da olduğu gibi genel anlamda incelenecek örneklerin uygun koşullarda alınması, saklanması ve gönderilmesi öncelikli olarak dikkat edilmesi gerekli hususlardır (15,70).

*Candida* enfeksiyonlarının tanısı amacıyla incelenecek örnekler arasında kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), idrar, steril vücut boşluklarından alınan sıvı, solunum

yolu, doku biyopsisi, ağız ve vajen sürüntü örnekleri ile deri, tırnak ve saçtan alınan kazıntı örnekleri sayılabilir (15,70). Bununla birlikte *Candida*'ların normal floranın bir üyesi olduğu unutulmamalı ve kültürden izole edilen mayanın etken olarak kabul edilebilmesi için örnek alınan klinik materyalin bölgesi ve hastaların klinik özellikleri göz önünde bulundurulmalıdır. Laboratuvar tanı için, etkenin klinik örnekten direkt mikroskopik olarak saptanması, kültürden izolasyonu, identifikasyonu ve histopatolojik olarak dokuda saptanması gerekmektedir (71).

#### 2.1.7.1. Mikroskopi

Kandidoz tanısında, öncelikle yapılacak işlem örneğin direkt mikroskopik incelemesidir. Deri ve tırnak kazıntıları inceleme için %10-30'luk KOH ile hazırlanır. Aynı zamanda boyalı preparatta hazırlanabilir. Epitel hücrelerinin ve keratinin erimesi ile maya hücreleri ve hifler daha iyi görülmektedir (72). Steril vücut sıvılarında, santrifüj sonrası Gram boya uygulanması ile maya yapılar gram pozitif olarak izlenmektedir (73). Mikroskopik inceleme ile psödohif yapılarının görülmesi özellikle mukokutanöz *Candida* enfeksiyonlarının tanısında değerlidir (72, 74). Çoğu maya hücresi kısmen veya tamamen gram pozitif boyanır ve bakterilerden daha büyük olmaları, tomurcuklanan hücrelerin varlığı ile bakterilerden ayırt edilir (Şekil 2.1.) (27).



Şekil 2.1. Gram Boyama ile Gram Pozitif Boyanan Maya Hücreleri (75).



### 2.1.7.2. İzolasyon

*Candida* türlerinin izolasyonununun sağlamak için hasta örnekleri Patates Dekstroz Agar veya Sabouraud Dekstroz Agar gibi rutin üretim besiyelerine ekilebilir. Primer izolasyon besiyelerlerinin bileşimine bakteri ve hızlı üreyen küfleri baskılayarak seçicilik sağlamak için çeşitli antimikrobikler (sikloheksimid, gentamisin, kloramfenikol vb.) eklenebilir. Oda sıcaklığında ve 37°C'de 24 saat içinde tipik, mayamsı kokulu, beyaz-krem renğinde yumuşak yapıdaki koloniler görülmektedir (18,73).



Şekil 2.2. Sabouraud Dekstroz Agar'da *C. albicans* Kolonileri (76).

Kültürde üreyen maya kolonilerini tanımlamada ilk yöntem germ tüp testidir. Uygulaması kolay, ucuz ve hızlı sonuç veren bu test *C. albicans*'ın diğer *Candida* türlerinden ayrımını sağlamada basit ama çok değerli bir testtir. Germ tüp yapımı için insan, koyun veya dana serumunda 35-37°C'de üç saatlik inkübasyon gereklidir. Germ tüp maya hücresinden parmak benzeri çıkıntı şeklinde uzayan gerçek hiftir. Bu yapı yalancı hiften, germ tüp ile maya hücresinin birleştiği yerde daralma olmaması ve germ tüpün duvarlarının birbirine paralel olması ile ayrılabilir (Şekil 2.3.) (18,27,72).



**Şekil 2.3.** Germ Tüp Yapıları (77).

Germ tüp testi pozitifliği etkenin *Candida albicans/dublinskiensis* olabileceği konusunda ön bilgi verebilir. *Candida albicans/dublinskiensis* germ tüp pozitifdir ve büyük oranda fenotipik benzerlik göstermektedir. Bu nedenle bu iki türü ayırt etmede klamidospor üretimi kullanılabilir (27). Bu amaçla tween 80 mısır unlu besiyeri kullanılmaktadır (32). Bu besiyerinde uç kısımlarında geniş, kalın duvarlı, klamidosporların ve septalarında yuvarlak blastokonidya kümelerinin bulunduğu psödohifler (bazen gerçek hif) oluşur (Şekil 2.4.) (34).

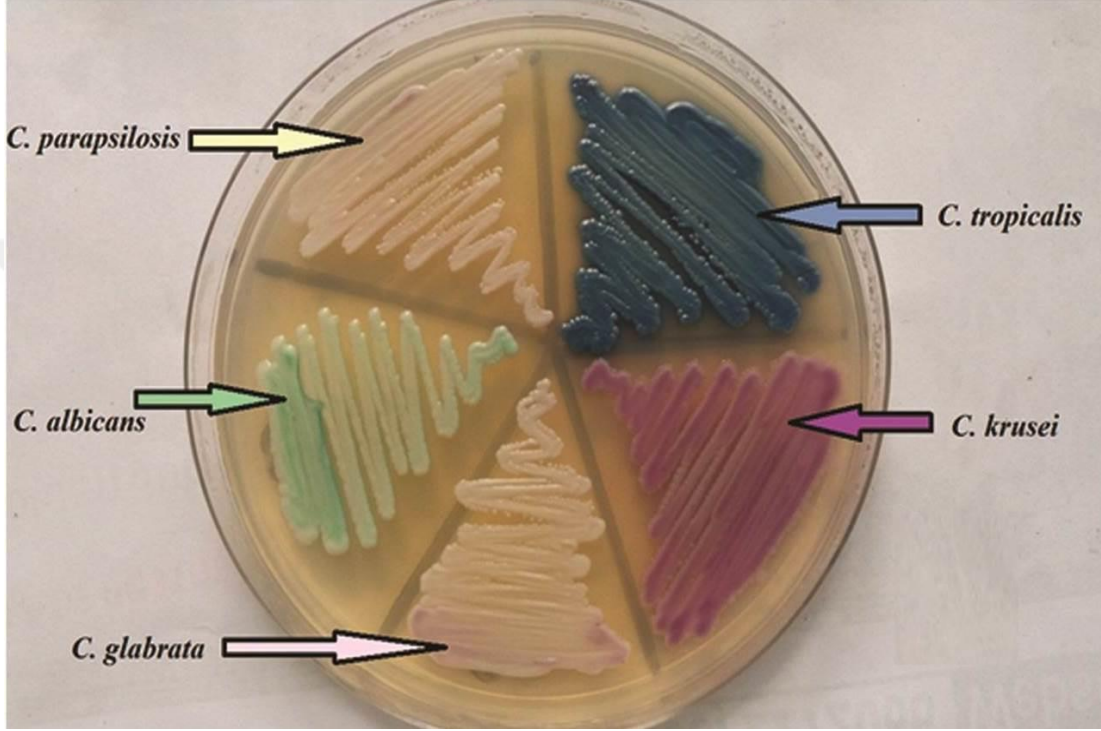


**Şekil 2.4.** *Candida albicans*'a Ait Klamidospor Yapıları (78).

### 2.1.7.3. Tiplendirme

İzolasyonda kullanılabilen bir diğer besiyeri de kromojenik besiyerleridir. Kromojenik besiyerlerinde *Candida* türlerinin koloni morfolojilerine ve renklerine göre ayrımları yapılmaktadır (Şekil 2.5.) (79). Bu besiyerleri, *Candida* türleri

tarafından üretilen enzimlerin etkileşime girmesi ile farklı renklere dönüşen kolonilerin elde edildiği kromojenik substratlar içerir (80). Bu besiyerleri tiplendirme basamağında kolaylık sağlamaktadır. Ancak *C. albicans* dışı *Candida* türlerinin tiplendirmesinde kullanılacak diğer testler karbonhidrat asimilasyonu ve fermantasyonudur. Asimilasyonda, mayaların oksijenli ortamda karbon kaynağı olarak bir karbonhidratı kullanma yetenekleri test edilmektedir.



Şekil 2.5. Kromojenik Besiyerindeki Farklı *Candida* Türleri (81).

Fermantasyonda ise karbonhidratların CO<sub>2</sub> ve etanol üretimiyle sonuçlanan anaerobik kullanımları gözlenir. Ancak bu testler uzun zaman almaktadır. Bu nedenle zamandan tasarruf etmek adına geliştirilmiş yarı otomatize hazır ticari sistemler bulunmaktadır. Bunlar ortalama 48-72 saatte sonuç verebilmekte ve geleneksel yöntemlerle %95'lere varan bir benzerlik gösterebilmektedir (18).

Bu konvansiyonel yöntemlerden başka son yıllarda hasta serumu ve vücut sıvılarında *Candida* türlerine özgül antikor ve antijenler, metabolitleri ve hüce duvarı bileşenlerini saptamaya yönelik testler geliştirilmiştir. Ancak bu testlerin en büyük eksikliği yeterli duyarlılıkta olmamalarıdır. Bu nedenle diğer tanı yöntemleriyle birlikte kullanılmaları önerilmektedir (32).

Fungal enfeksiyonlarda patojenin en kısa sürede tanımlanıp uygun tedaviye başlanması prognoz açısından önem taşımaktadır. Erken spesifik tanı ve tedavi

gereksinimlerine bağlı olarak ön plana çıkan moleküler tanı yöntemleri etyolojik tanıda hız, duyarlılık ve bazı durumlarda da özgüllük artışına neden olmaktadır. Moleküler tanı yöntemleri; klinik örnekte *Candida* varlığının ve türünün saptanmasında, epidemiyolojik tiplendirmede, virülans faktörlerinin belirlenmesinde, antifungal direnç genlerinin araştırılmasında, mutasyon incelemelerinde, sınıflandırma ve filogenetik analizlerde kullanılmaktadır. Bu amaçla hibridizasyon yöntemleri, nükleik asit çoğaltma yöntemleri ve restriksiyon enzim analizi gibi moleküler testler kullanılabilir (82).

### **2.1.8. Tedavi Seçenekleri**

*Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde farklı grup antifungal ilaçlar kullanılmaktadır. Antifungal ilaçlar; azol türevi bileşikler, ekinokandinler ve poliyenlerden oluşmaktadır (72). Antifungal ilaçların çoğunun ciddi yan etkiler, dar antifungal spektrum, dokulara kötü penetrasyon ve dirençli mantarları seçme gibi birçok olumsuz özellikleri vardır. Umut vaat eden yeni ilaçlar geliştirilmekte ve bunların bir kısmı klinik olarak denenmektedir. Ancak mantar hücrelerinin insan hücreleri gibi ökaryot yapıda olmalarının yanısıra hücrenel ve moleküler süreçlerinin çoğunun benzer olması ve hatta proteinler ile genler arasında oldukça fazla benzerlik bulunması, uygun bir antifungal hedef bulunmasını zorlaştırmaktadır (83).

#### **2.1.8.1. Poliyenler**

Amfoterisin B ve lipid formülasyonları poliyen bileşiklerdir. Ergosterole bağlanarak fungal membranda por oluştururlar. Bu suretle membran permeabilitesini arttırıp ozmotik bütünlüğü bozarak fungusit etkiye neden olurlar. Sistemik kandidoz tedavisinde kullanılan başlıca geniş spektrumlu bir ilaçtır. Emilim özelliklerinden dolayı sadece parenteral formu mevcuttur. Nefrotoksisiteden ötürü lipid formülasyonları (lipozomal amfoterisin B, amfoterisin B lipid kompleks) geliştirilmiştir. Bunlar az toksik ve güvenilir olup iyi tolere edilmektedir (72).

#### **2.1.8.2. Azoller**

Azoller, lanosterolden ergosterol sentezinde yer alan sitokrom P450 14 $\alpha$ -demetilaz enzimini inhibe ederek mantar hücre membranının sentezini sonlandırır. Genelde fungistatik etkiye sahiptirler. Bu bileşikler iki alt gruba ayrılır: imidazol ve triazoller (72).

### **İmidazol**

Ketokonazol, imidazol türü bir bileşiktir. Sistemik ve kutanöz kandidoz tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Ancak hepatik ve gastrik toksisitesinden dolayı ve daha az toksik alternatif ilaçların klinik kullanımda olmasından dolayı nadir kullanılmaktadır (72).

### **Triazoller**

Flukonazol, kandidoz tedavisinde ve ayrıca transplant olgularının profilaksi ve kronik supresyon tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Gastrik, hepatik ve endokrinolojik yan etkilerinin düşük olması ve beyin omurilik sıvısına (BOS) iyi geçmesi avantajlarıdır. Flukonazol birçok *Candida* türüne etkilidir, ancak *C. krusei* flukonazole karşı doğal direnç sergilemektedir (72).

İtrakonazol, geniş spektrumlu antifungal etkiye sahip bir ilaçtır. En önemli avantajı *Aspergillus* spp.'ye de antifungal etki gösteriyor olmasıdır. Kandidoz tedavisinde kullanılmakta, özellikle diğer azollere cevapsız olgularda, örneğin flukonazole dirençli *C. krusei* ve *C. glabrata* suşlarının bir kısmına etkili olabilmektedir. Kök hücre transplantasyonunun uzun dönem profilaksisinde ise flukonazole göre üstünlük gösteren bir ilaçtır (72).

### **Yeni triazoller**

Vorikonazol ve posakonazol geniş antifungal etki spektrumuna sahip olarak birçok *Candida* türüne etkilidir. İnvaziv fungal enfeksiyonlarda kullanılmaktadır ve flukonazole ve itrakonazole karşı dirençli olan *Candida* türlerinin bazılarında karşı etkili olduğu gösterilmiştir. İkisinin arasındaki en büyük fark posakonazolün ayrıca *Zygomycetes* spp.'ye karşı da etkili olmasıdır (72).

### **2.1.8.3. Ekinokandinler**

Ekinokandinler 1,3- $\beta$ -D-glukan sentezini inhibe ederler ve mantar hücre duvar sentezini durdurarak fungistatik etki göstermektedirler. Bu grupta kaspofungin, mikafungin ve anidulafungin yer almaktadır. Sadece parenteral formları mevcuttur ve oldukça düşük seviyede toksisiteye yol açan güvenli bileşiklerdir. Geniş antifungal etki spektrumuna sahip olmakla beraber amfoterisin B ve flukonazole dirençli *Candida* türlerine de etkili olmaları en önemli avantajlarından birisidir. Kullanım endikasyonlarının arasında özellikle özofageyal kandidoz ve kandidemi yer almaktadır. Ayrıca kaspofungin antibakteriyel tedaviye yanıt vermeyen febril

nötropenide ampirik tedavi olarak kullanılmaktadır. Mikafungin ise hematopoetik kök hücre transplantasyon olgularında flukonazolden daha üstün olup antifungal profilakside kullanılmaktadır (72).

#### **2.1.8.4. Nükleik Asit Sentez İnhibitörleri**

Flusitozin florlanmış bir primidin olup antimetabolit olarak etki gösterir. Oral formu bulunmaktadır. Mantar hücrelerindeki protein, DNA ve RNA sentezini engelleyerek antifungal etkinlik gösterirler. Flusitozinin antifungal etki spektrumunda, *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula* türleri, *Sacharomyces cerevisiae* ve bazı esmer küfler bulunmaktadır. Sekonder direnç gelişme ihtimalinden dolayı amfoterisin B veya flukonazolle kombine edilerek kullanılır (84).

#### **2.1.9. Antifungal Direnç**

Antifungallere direnç mekanizmalarının anlaşılmasında en büyük rolü, invaziv mikozların en sık etkeni olması sebebiyle *Candida* türleri oynamaktadır. *Candida* türlerinin direnç gelişimi amacıyla antifungal ilaçlarda değişiklik oluşturma özelliklerinin olduğuna dair bir kanıt bulunmamaktadır. Ayrıca antifungal direnç genleri hücreden hücreye aktarılmadığı bu nedenle de antifungal direncin antibakteriyel dirence göre daha yavaş geliştiği gösterilmiştir. Dirençte rol oynayan mekanizmalar dışa atım pompaları, hedef değişiklikleri ve ilacın hedef bölgeye girişinin azaltılması olarak sıralanabilir (84).

Antifungal ilacın *Candida* türlerine karşı etkili olması, klinik başarı için yeterli değildir. Konak, ilaç ve etken patojenin birbirleri ile etkileşimleri, konağın bağışıklık durumu, enfeksiyonun yeri ve şiddeti, yabancı cisim varlığı, enfeksiyon bölgesinde ilacın etkinliği, tedavinin dozu ve süresi ile antifungal rejime hastanın uyumundan etkilenmektedir (84).

## **2.2. Trombositler**

### **2.2.1. Giriş**

Kemik iliğindeki megakaryosit adı verilen öncü hücrelerden üretilen, ortalama yaşam süreleri 7 ila 10 gün olan, renksiz, 2-4 µm çapında, disk şeklindeki çekirdeksiz hücrelerdir. Hemostaz, enflamasyon, antimikrobiyal direnç, anjiyogenez

ve doku iyileşmesi gibi vücuttaki önemli fonksiyonlarda görev alırlar (85). Yaşam süresinin çoğunu sessiz, doku hasarına ve mikrobiyal tehdide karşı “nöbetçi” olarak geçirirler (86). Trombositlere bekçi hücre ya da gardiyan hücre denilmesinin en önemli nedeni muhtemel zararlı mikroorganizmaların varlığını tespit etme yeteneklerindedir.

İnsanda kandaki toplam trombosit sayısı 150.000-400.000/ $\mu$ l'dir. Kanda eritrositlerden sonra en çok bulunan hücre grubunu oluştururlar (87). Eritrositlerde olduğu gibi bunlar da çekirdeksizdirler. Trombositler, plazma membranının sitoplazma içerisine parmak şeklinde uzantılarından oluşan bir kanal sistemine sahiptirler. Bu sistem sayesinde sitoplazmada bulunan aktif moleküllerin dış ortama atılmasını sağlayan fonksiyonel bir yapı oluşmuş olur. Trombosit hücre duvarı üzerinde birçok girinti, çıkıntı ve veziküller vardır. Bu yüzden morfolojik olarak deniz süngerine benzetilir (88).

### 2.2.2. Tarihçe

Günümüzde trombositlerin enfeksiyonlara karşı konak savunmasına katkıda bulunan yapı ve fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir. Son 10 yılda konak patojen ilişkisini araştırmak için yeni tekniklerin gelişmesi, protein kimyasının daha iyi bilinir hale gelmesi ve moleküler biyolojinin gelişmesi ile konak savunmasında trombositlerin rolü daha iyi anlaşılmıştır. Trombositler bakteriyel patojenler ile hızlı, direkt ve spesifik olarak etkileşime girerek çeşitli antimikrobiyal etkinlik gösteren molekülleri ortama salarlar ve kazanılmış immün yanıtı şekillendirirler (86,89-94).

Trombositlerin antimikrobiyal özelliklerinden ilk olarak, Fodor ve ark. tarafından ısı hassas veya  $\alpha$ -lisin kompleman proteinlerinden ayrı olarak ısı stabil bakterisidal kapasitesi olan serum proteinine  $\beta$ -lisin adını verdikleri 1887 yılındaki çalışmalarında değinilmiştir (95). 1901 yılında Gengou ve ark.  $\beta$ -lisinin serumdaki bakterisidal aktivitesinin koagülasyon yeteneği içeren serum hücrelerinden kaynaklandığını ve komplemandan bağımsız olduğunu göstermiştir (96). 1938 yılında Tocantins ve ark. yapmış oldukları çalışmalar ışığında trombositlerin immün sistem fonksiyonlarının olabileceğini iddia ettiler (97). Sonraki çalışmalarda Hirsch tarafından trombositlerin tavşan serumunda bakterisidal aktivitesinin olduğu gösterilmiştir (98). Nihayetinde birçok diğer araştırmacı da trombositlerin *Bacillus*,

*Staphylococcus*, *Listeria*, *Salmonella* gibi birçok organizmaya karşı bakteriyostatik ve/veya bakterisidal etkinliğe sahip olduğunu gösterdiler (89).

Sonraki çalışmalarda birçok araştırmacı serumda antimikrobiyal aktiviteye yol açabilecek trombosit spesifik moleküller üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalardan ilki sayılabilecek olan Myrvik'in çalışmasında, trombosit kaynaklı iki serum faktörünün *Bacillus subtilis*'e karşı etkili olduğu gösterildi (89,99). Başka araştırmacılar bu bulguları doğruladılar (99,100). Sonrasında diğer araştırmacılar tavşan serumundan  $\beta$ -lisin olduğu kabul edilen ve *S. aureus* ve *B. subtilis*'e özgü antimikrobiyal etki gösteren molekülleri izole ettiler (101,102). Bunlara paralel olarak Weksler ve Nachman trombositlerden *B. subtilis* ve *S. aureus* suşlarına karşı in vitro bakterisidal aktivite gösteren 10 ve 40 kDa ağırlığında iki katyonik proteini izole ettiler (103). Bu çalışmaların hepsinde trombosit antimikrobiyal etki molekülleri katyonik özellik gösteren ve kütleleri 6-40 kDa arasında değişen küçük moleküller olarak tanımlandılar. Tew ve ark.  $\beta$ -lisin moleküllerinin trombin ile stimüle edilen tavşan trombositlerinden salındığını ve doku hasarı ile konak savunmasında görevli moleküllerin trombositlerden salındığına dair bir bağlantının olduğunu gösterdiler (104).

### 2.2.3. Trombositlerin Aktivasyonu

Trombositlerin aktivasyonu beş farklı yöntem ile olabilmektedir. Bunlar sırası ile vasküler yapının ya da doku bütünlüğünün bozulması, soğuğa maruziyet, trombin ile etkileşim, kalsiyum glukonat vb. kimyasallar maddeler ile etkileşim ve son olarak değişik dalga boyundaki ışınlar ile etkileşim olarak sayılabilir (86,89).

Aktive olmamış istirahat halindeki trombositlerin yüzeyinde toll benzeri reseptör 2 (Toll Like Receptor 2, TLR2), TLR4 ve TLR9 düşük seviyede bulunur (89,105). Trombositlerin aktivasyonu ile bu reseptörler önemli derecede artar. Örneğin; özellikle bakteriyel enfeksiyonlar aracılığıyla oluşma ihtimali yüksek olan vasküler lezyonlarda TLR1 ve TLR6 ekspresyonu artarken, trombin aktivasyonu da TLR9 ekspresyonunu önemli derecede artırır (106).

Trombositler aktive edildiklerinde, antimikrobiyal konak savunmasındaki birçok görevlerini kendilerine özgü yollarla ortaya koymaktadır (86,89). Bunlar;

- a. Diskoid yapıdan fagositozda önemli rol alan ameboid şekle dönüşüm,
- b. Granül taşınması ve organizasyonunu kolaylaştırmak adına hücre iskeletinin



- yeniden yapılandırılması,
- c. Hasarlı veya enfekte dokulara adezyon artışına aracılık eden reseptörlerin salınımı,
  - d. Hücre metabolizmasının aktif hale gelmesi
  - e. Doku hasarı veya enfeksiyon bulunan bölgelere doğru hareket ve bu bölgelerde yoğunlaşma,
  - f. Konakçı hücrelerle olduğu kadar mikrobiyal patojenlerle de etkileşime giren psödopodların uzaması,
  - g. Konakçı hücre savunma peptidlerini de içeren önceden oluşmuş granül moleküllerinin salınımı ve işlenmesi.

#### **2.2.4. Trombositlerin Özellikleri**

Çoğu omurgasız ve erken omurgalı canlılarda hemosit adı verilen bir hücre tipi tüm hemostatik fonksiyonu ve konak savunma fonksiyonlarını bir arada taşır. Memelilerde ise evrimle birlikte hücre tipleri ve görevleri daha özelleşmiştir. Trombositlerde konak savunması ve hemostazı birbirine bağlayan hayati ve duyarlı hücrelerdir (89).

Nötrofil, bazofil ve eozinofiller tipik olarak gerekli insan granülositleri olarak kabul edilmektedirler. Bununla birlikte trombositlerde hem hücre içine hem de hücre dışına salınabilen granüller içerdiğinden granülosit olarak sınıflandırılabilirler. Trombositlerde genel olarak üç tip granül bulunmaktadır (89,91,107).

Birincisi dense ( $\delta$ ) granüller olup; vasküler tonus mediyatörlerini içerir. Bunlar nükleotidler (ADP, GTP), biyoaktif aminler (histamin, serotonin) ve biyoaktif ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{PO}_3^-$ ) minerallerdir.

İkincisi alfa ( $\alpha$ ) granüller olup; adezyon molekülleri, trombosit mikrobisidal proteinleri (PMP) ve kinosidinler, koagülasyon faktörleri, mitojenik faktörler ve proteaz inhibitörlerinden oluşan beş farklı proteini ihtiva etmektedir.

Üçüncüsü lizozomal ( $\lambda$ ) granüller olup; doku yenilenmesini ve yara iyileşmesini sağlayan trombosit-fibrin tıkaç oluşumunu yönlendiren proteaz ve glikozidaz gibi çeşitli enzimleri içermektedir (86).

Trombositlerin enfeksiyona karşı konak savunmasına katkısına dair birçok delil bulunmaktadır. Örneğin; trombositler de nötrofil ve monositlerle ortak yüzey antijenlerini taşımaktadırlar. Bunlar, yaklaşık 40kDa ağırlığındaki Fc $\gamma$ RII reseptörü,

Ig E için FcεRI reseptörü, C-reaktif protein reseptörü ve trombospondin CD36 (GPIV) reseptörleridir (89). Ayrıca trombositler kompleman CR3 reseptörü, kompleman fiksasyon ürünü olan C3a ve C5a için reseptörler içerirken, tümör nekrozis faktör-α (TNF-α), interlökin-1 (IL-1) ve IL-6 gibi sitokinlere karşı duyarlı olup, bu sitokinlere karşı lökositlerin konak savunmasında oynadığı role benzer yaklaşım sergilemektedirler (89). Bunlara ilaveten trombositler konak kan akımı ve dokularında bulunan patojenleri içlerine alabilmektedirler. Bu işlemin henüz gerçek bir fagositoz olup olmadığı açıklanamamıştır (86).

### **2.2.5. Trombositlerin Kemokin-Kinosidin Özellikleri**

Trombositler doku travması, endoteliyal hasar ve enfeksiyon odaklarına hızla ve yoğun bir biçimde hareket ederler. Bu tip alanlara göç ederek oralarda biriken ve yoğunlaşan ilk hücrelerdir. Her ne kadar trombositlerin bu hareket tarzı belirgin hemostatik avantajlar sağlasa da doku hasarının olduğu bölgelere yönelmede enfeksiyona karşı erken müdahalede de anahtar bir rol oynamalarını sağlamaktadır (86).

In vitro ve deneysel hayvan modellerinde, trombositlerin aktif olarak patojenleri hedef aldığı, bakteri spesifik proteinler, kompleman proteinleri (C3a ve C5a) ve akut faz yanıtının olduğu yerlerde biriktiği gösterilmiştir (86,107). Bakteriyel N-formil peptidler, trombositler üzerindeki N-formil peptid reseptörlerine özellikle bağlanma eğilimindedir. Neticede trombosit hücre yapısında yeniden düzenleme ve kalsiyum salınımı ile birlikte aktivasyon ve degranülasyon meydana gelir. Trombositlerin enfeksiyon bölgesinde ürettikleri ve ortama saldıkları birçok kemokin ve kinosidin reseptörü mevcuttur. C3a ve C5a ile birlikte kemotaktik sinyalleri algılayan trombositler, kemokinleri ortama salarlar. Bu kemokinler de sırası ile C, CC, CXC ve CX<sub>3</sub>C olup reseptörleri ise CCR1, CCR3, CCR4, CXCR4'dür (108). Konak savunma mekanizmasının en önemli yapı taşlarından birini bu kemokin ve reseptörler ile bağlanma ve aktivasyon oluştururken kemotaksiste önemli rol oynar. Ayrıca kinosidin olarak bilinen mikrobisidal kemokinlerde (kemokin ligand 4; CXCL4 diğer adıyla PF-4 ve kemokin ligand 5; CCL5 diğer adıyla RANTES) aktive trombositlerden salınarak diğer immün sistem hücrelerinin enfeksiyon bölgesine kemotaksisini yönlendirebilir (109).

### 2.2.6. Trombositlerin Konak Hücre Savunmasındaki Rollerini

Trombositler mikrobiyal patojenlerin erken tespitinde rol oynadıkları gibi konak savunmalarının iyileştirilmesi ve aktivasyonunda da görev almaktadır (86).

#### 2.2.6.1. Amplifikasyon Basamakları

Trombositlerin konak savunma fonksiyonlarını aktive etmede önemli bir adım olarak değerlendirilmektedir. Trombositler *S. aureus* gibi mikroorganizmalar ile karşılaşır aktive olduklarında  $\delta$  granüllerinden ADP ve ATP,  $\alpha$  granüllerinden PMP'ler ve kinosidinler salınır. Salınan ADP ve ATP istirahat halindeki trombositlerde bulunan P2X<sub>1</sub> ve P2Y<sub>12</sub> adenonükleotid reseptörlerine bağlanır. Böylelikle istirahat halindeki trombositler aktive olurlar ve PMP ve kinosidin seviyelerinin daha da artmasına yol açarlar (86,110). Artan PMP ve kinosidin seviyeleri de konak savunmasını enfeksiyon karşısında güçlendirmektedir.

Zhang ve ark.'nın (86,111) akut enfeksiyon modeli oluşturdukları deneysel hayvan çalışma modelinde, trombosit inhibitörü verilen gruptaki farelerde *S. aureus*'un ortadan kaldırılmasında azalma görülürken, mortalite oranında artış olduğunu gözlemişlerdir. Bu çalışmada mikroorganizmaların trombosit degranülasyonunu ve ADP sekresyonunu bozarak konakçı savunmasından kaçmaya çalışmasının mümkün olduğu gösterilmiştir. Örnek olarak *S. aureus*'un adenozin sentaz (AdsA) enziminin, ADP'yi AMP'ye hızla hidrolize edebilen ve bakterinin konakçı immünitesinden korunmasını sağlayan bir virülans faktörü olduğu gösterilmiştir (112).

#### 2.2.6.2. Trombosit Mikrobisidal Proteinleri (PMP) ve Kinositinler (PK)

Trombositler direkt antimikrobiyal etki gösteren değişik yapıda protein ve peptid içeren granüller bulundurmaktadır. Trombositlerden salınan mikrobisidal proteinler başlıca dört ana grupta toplanır. Bunlar (89,91,107);

- a. **Kinosidinler:** Trombosit faktör 4 (PF-4, CXCL4), Trombosit bağlayıcı protein (PBP, CXCL7), normal T lenfosit hücrelerinin ekspresyonu ve salınımı (RANTES, CCL5) olarak sayılabilir.
- b. **Defensinler:** İnsan  $\beta$  defensin 2 (BD2), timosin  $\beta$ 4 (T $\beta$ 4),
- c. **Antimikrobiyal peptid türevleri:** Fibrinopeptid A, fibrinopeptid B,
- d. **Trombosidinler:** CXCL7'nin proteolitik türevleridir.

Klasik defansinler dışında diğer antimikrobiyal moleküllere topluca PMP denmektedir.

Kinosidin kaynaklı peptidler bakteriyel ajanlara karşı hızlı, güçlü antimikrobisidal aktiviteye sahiptirler. Özellikle *S. aureus*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium mikroorganizmalarına karşı nötral pH'da etkinliği daha yüksek izlenirken, aynı organizmalara karşı etkinliği pH 5.5'de çok azdır (113). Aksine kinosidinlerin anti-*Candida* özelliği pH 5.5'de güçlü iken, bakterilerin tam tersine nötral pH'da ise daha zayıftır. Bu yüzden, bir kinosidinin mikrobiyal bir hedefe saldırmasının anatomik ve fizyolojik içeriği onun seçici toksisitesi ile ilgilidir (114).

Son dönemde trombositlerin verdiği antimikrobiyal yanıtın moleküler etkileri yoğun bir biçimde araştırılmaktadır. PMP'nin bir alt kolunun mikrobisidal aktiviteye sahip olan klasik kemokinler olduğu anlaşılmıştır. Bu polipeptidler hem kemokin hem de mikrobisidal etkiye sahip fonksiyonlarını yansıtacak şekilde kinosidin olarak isimlendirilmiştir. Trombositler birden çok direkt antimikrobiyal aktiviteye sahip kinosidinler ihtiva etmektedir (86,115).

Trombin gibi proteazlar, doku hasarını veya enfeksiyonu takiben konak hücresi tarafından üretilir ve kinosidinleri bölerek otonom mikrobisidal parçalar halinde fonksiyon görmeleri için serbestleştirir (92,116,117). Özellikle vasküler enfeksiyon bölgesinde trombin üretiminin olduğu ve bu trombinin trombositler üzerindeki degranülasyonu güçlü bir şekilde tetiklediği gösterilmiştir. Bu durum endovasküler konak savunmasına cevabın PMP ve kinosidin salınımı ile nasıl koordine edildiğini göstermektedir (117). Trombin (serin proteaz), trombosit kaynaklı proteazlar, doku hasarı ile ortaya çıkan proteazlar doğal PMP ve kinosidinleri işleyerek çok sayıda antimikrobiyal peptid alt tipi oluşturur. PMP, kinosidinler, bunların parçaları ve sentetik türevleri in vitro, ex vivo ve in vivo olarak gram pozitif ve gram negatif bakteriler ile mantarlara karşı güçlü bir antimikrobiyal etki gösterirler (92). Birçok araştırmacı tarafından spesifik patojenlerin veya pürifiye stafilokokal  $\alpha$  toksinin, trombositlerden in vitro olarak PMP ve kinosidin salınımını tetiklediği gösterilmiştir (118,119).

Sonuç olarak konak savunmasında görevli peptidler, klasik toksinler ve benzeri moleküller arasındaki yapısal, fonksiyonel ve evrimsel keşifler konak

savunma mekanizmalarını anlamamıza yenilikçi bir yaklaşım getirmiştir. Yine bu keşifler minimal konak sitotoksitesine sahip anti-enfektif peptidlerin geliştirilmesi için fırsatlar yaratmıştır (120). Kinosidinler doğal bağışıklık yanıtı ile kazanılmış bağışıklık yanıtı oluşturur ve önemli immünolojik mekanizmaları yönetir. Kinosidinlerin iyi tanımlanmış kemotaktik fonksiyonları ile lökosit ve lenfositlerin enfeksiyon alanına toplanmasını sağladığı ve bu hücrelere ait antimikrobiyal mekanizmaları aktive ettikleri bilinmektedir.

Kinosidinlerin enfeksiyonlara karşı konak savunma mekanizmasını nasıl çalıştırdığı bazı araştırmacılarca tanımlanmıştır (120,121). Buna göre mikroorganizmaya karşı yanıt olarak trombositler aktive olur. Aktivasyon sonrası PMP, kinosidin ve ADP/ATP degranülasyonu yaşanır. Degranüle olmuş olan ADP komşu trombositlerdeki P2X<sub>1</sub>/P2Y<sub>12</sub> reseptörlerine bağlanarak trombositleri aktive eder. Böylece aktive olmuş trombositlerden tekrar PMP ve kinosidin salınımı gerçekleşir. Bu döngü enfeksiyon sınırlandırılana kadar devam eder.

### **2.2.7. Diğer Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları**

Konak savunma peptidlerine ilaveten trombositler diğer antimikrobiyal faktörleri de üretebilir. Hidrojen peroksit ve diğer reaktif oksijen radikalleri trombositlerin uyarılmasına cevap olarak nötrofillerde üretilenden daha az miktarda olsa da üretilir. Bu özellikleri nötrofillerde olduğu gibi baskın değildir (86,122). Bununla birlikte, oksijen radikallerinin trombositlerin antihelmintik aktiviteleri için kaçınılmaz olduğu raporlanmıştır (122). Bu etki mekanizmasına ilaveten trombositlerin potansiyel fagositoz rolü olduğu bilinmekle birlikte bu durumu destekleyen ileri çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır. Fakat trombositler klasik fagositozdan ziyade patojenleri kaplayarak “coversytes” olarak da adlandırılacak bir fonksiyon ortaya koymaktadırlar (123). Bu tarz fagositozda bakterilerin trombositler tarafından hücre içine alınması açık kanaliküler sistem aracılığıyla olmaktadır. Son olarak trombositlerin büyük antimikrobiyal kompleksler için bir platform olarak görev yaptıkları da ileri sürülmüştür. Örneğin trombin, aktive trombositlerin yakınlarında bakterisidal kompleksler oluşturmak için >100 kDa plazma proteinlerini aktive ettiği, bu aktivasyon sonrasında antimikrobiyal etki gösterdikleri de gösterilmiştir (124).

### 2.2.8. İmmun Yanıtın Güçlendirilmesinde Trombositlerin Rolü

PMP, kinosidin ve diğer etkin moleküllerin direkt antimikrobiyal aktivitesine ilaveten trombosit yanıtı birçok konak savunma mekanizmasını tetikler ve enfeksiyon bölgesine savunma hücrelerini çekmektedir (86). Örneğin, bakteriyel enfeksiyonlara karşı konak savunmasında trombositlerin nötrofiller ile etkileşimi anahtar rol oynamaktadır. Mikrobiyal ligandlar trombositler tarafından Toll-benzeri reseptörler (TLR) aracılığıyla tanınırlar. Sırasıyla, TLR aracılı sinyal iletimi trombosit yüzeyinde belirli bazı ligandların ve glikoproteinlerin üretimini artırır. CD62P, trombositleri nötrofil ve monositlere özellikle P-selektin glikoprotein ligand 1 (PSGL-1; diğer adı CD162) aracılığıyla bağlayan en önemli liganttır (125). Fakat PSGL-1'in inhibisyonunun trombosit-monosit etkileşimini önlemede yetersiz kaldığı göz önünde bulundurulduğunda diğer birçok ligand ve glikoprotein muhtemelen bu bağlanmaya katılmaktadır (125,126). Bu şekildeki trombosit-mikroorganizma etkileşimi nötrofil fagositozunu ve patojenlerin intrasellüler ortamda öldürülmesini artırırken hızlı bir biçimde her iki konak hücrelerinin aktivasyonuna yol açan trombosit-nötrofil kompleksi oluşumunu da kolaylaştırır (102). Hasarlı ya da enfeksiyonun olduğu bölgeye kinosidinler veya diğer kemoatraktanlar tarafından çekilen nötrofiller “nötrofil hücre dışı tuzağı” (NET) oluştururlar. Bu elektronegatif DNA komplekslerinin katyonik konak savunma peptidlerini (PMP, kinosidin ve defensinler) arttırdığı ve mikroorganizmaları tuzağa düşürdüğü düşünülmektedir (127,128). Aynı şekilde trombositler nötrofillerin Gram pozitif ve negatif bakterilere yanıtta kullandığı oksidatif patlamanın gücünü arttırmaktadır (129).

Nötrofillere ilaveten trombositler dendritik hücreleri de aktive ederler. Bu aktivasyon dendritik hücrelerin T ve B lenfositlere patojen antijenlerinin sunumunu ve bu hücrelerin olgunlaşmasını kolaylaştırır (86). Farklı glikoproteinler aracılığıyla trombositler bakterileri tanıyarak etkileşime girerler ve bunun bir sonucu olarak mikroorganizmaların dalaktaki dendritik hücrelerde birikmesini sağlarlar. Bu süreç sonunda mikroorganizmalara ait antijenlerin işlenerek T lenfositlere sunumu kolaylaşmaktadır. Bu etkiler CD8<sup>+</sup> T lenfositlerin çoğalmasını kolaylaştırır. Ayrıca trombositler ile etkileşim sonrası dendritik hücrelerden sitokin üretimi artar (86,130).

Trombositler ayrıca mikrobiyal patojenlere karşı kazanılmış bağışıklık yanıtının bir parçası olan B lenfosit cevabını da koordine ederler. Bu kazanılmış

yanıt trombositlerin CD4<sup>+</sup> T lenfositlere yardımı ile olmaktadır. Bu etkileşim sonunda uzun süreli IgG üretimi olmaktadır (86,131). Bu sonuçlar trombositlerin IgG gibi anahtar role sahip antikorların üretimi için B lenfosit aktivasyonunu gerekli kılan T ve B lenfositlerin birbirleriyle etkileşiminde köprü görevi gösterdiğini ortaya koymaktadır (86).

Sonuç olarak; trombositler çeşitli TLR üreterek ve nötrofiller ile muhtemelen T ve B lenfositler arasında etkileşimde köprü oluşturarak, bakteriyel patojenlerin moleküler yapılarını ve erken uyarı sinyallerini tanıyarak bakteriyel patojenleri doğrudan ya da dolaylı olarak tespit ederler (89).

### **2.2.9. Trombositlerin Çeşitli Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri**

Trombositler ve mikrobisidal proteinleri ve kinosidinler viral, bakteriyel, fungal ve protozoan patojenlere karşı hızlı, direkt ve güçlü etkinlik gösterirler (86,89,91,107). Son dönemde kinosidinlerin antimikrobiyal konak savunmasındaki bilinirliği artmaktadır.

#### **2.2.9.1. Bakteriyel Patojenler ile Trombositlerin Etkileşimleri**

Trombositler her türlü mikroorganizma ile (virüs, bakteri, mantar ve protozoa) etkileşime girerler. Fakat her mikroorganizma için farklı etki mekanizmaları söz konusudur. Bu etkileşimler direkt ya da dolaylı olabilir ve belirgin antimikrobiyal yanıtı ve mekanizmaları ortaya koyabilir (89-94,132). Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda sırasıyla trombositlerin bakterilere öncelikle yapıştığı, kümelendiği, aktive ve degranüle olduğu gösterilmiştir (133-135).

Trombosit-bakteri etkileşimi aşama aşama belirgin bir biçimde ortaya konmuştur;

1. Direkt temas
2. Morfogenez
3. Başlangıç kümelenmesi
4. Geri dönüşümsüz kümelenme

Trombosit-bakteri etkileşiminin bu aşamaları bakteriden bakteriye hatta aynı cinsin farklı türlerinde bile farklı olabilmektedir. Örneğin *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ve *Escherichia coli* hızla trombositlere

yapıştır ve kümelenmeyi in vitro olarak artırır (133-135). Bu mikroorganizmaların dışında *Fusobacterium*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Yersinia*, *Pseudomonas* ve *Salmonella* gibi farklı patojenik türlerinde trombositlerle etkileştiği ve in vitro kümelenmelerine yol açtıkları gösterilmiştir (133-139). Bunların aksine kan dolaşımı enfeksiyonu yapabilen *Staphylococcus epidermidis* ve *Streptococcus pneumoniae* gibi patojenler geri dönüşümsüz kümelenmeyi tetiklemez (133).

### **Gram Pozitif Bakteriler ile Trombositlerin Etkileşimi**

Gram pozitif bakterilerin trombositlerle etkileşiminde gösterilmiş çeşitli mekanizmalar vardır. Başlıcaları;

1. Trombositler ile *S. aureus* toksinlerinden biri olan  $\alpha$  toksin ile yapılmış çalışmalarda bu toksinin eritrosit, trombosit hatta lökosit hücre membranı ile etkileşime girerek hasar oluşturduğuna ve nihayetinde hücresel lizis yaptığına inanılmaktadır (89).

2. Benzer şekilde *S. aureus* protein A, konak IgG, trombosit Fc reseptörleri etkileşimi ile trombosit kümelenme, degranülasyon ve morfolojik değişiklikler yolağının tetiklendiğini göstermişlerdir (89).

3. Son dönemde yapılmış bir çalışmada ise trombositlerin *S. aureus*'u aktif bir şekilde fagosite ettiği gösterilmiştir (140).

### **Gram Negatif Bakteriler ile Trombositlerin Etkileşimi**

Gram negatif mikroorganizmaların trombosit etkileşim mekanizmaları Gram pozitif mikroorganizmalar kadar net ortaya konmuş değildir. Son dönemde kabul gören görüş kan dolaşımı ile ilişkili enfeksiyon yapabilen gram negatif patojenlerin trombositler ile önemli etkileşimleri olduğu ve bu etkileşimin virülans ve konak savunması arasında bir denge oluşturduğu yönündedir (89-94). Bu etkileşimi gösteren en iyi örnekler *Pseudomonas aeruginosa* ve *Yersinia* türleridir. *P. aeruginosa*'nın majör virülans faktörü olan fosfolipaz C doza bağımlı trombosit kümelenmesine neden olur (141). Ayrıca yapılan son çalışmalarda *P. aeruginosa*'nın fosfolipaz A2 yapısının trombositler ile etkileşimleri incelenmiş ve bu virülans faktörüne sahip suşların bu faktörü içermeyen *P. aeruginosa* suşlarına nazaran daha ölümcül olduğu gösterilmiştir (142).



*Yersinia* türleri ile trombositlerin in vitro etkileşiminin araştırıldığı bir çalışmada bu etkileşimin trombosit kümelenmesi ile sonuçlandığı gösterilmiştir (143). Başka bir çalışmada ise sadece *Y. pseudotuberculosis*'in trombositlerin aktivasyonuna ve kümelenmesine neden olduğu *Y. enterocolitica*'nın ise yapmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte *Y. enterocolitica*'nın da pYV plazmidi içeren suşunun trombositler ile etkileşime girdiği, pYV içermeyen suşların ise etkileşime girmediği gösterilmiştir (86,89,143).

#### **2.2.9.2. HIV-1 ile Trombositlerin Etkileşimi**

Son çalışmalarda trombosit aktivasyonunun ve CXCL4 (PF-4) salınımının HIV-1 enfeksiyonuna karşı olan konak savunmasında anahtar rolü olduğu gösterilmiştir (144). Başka bir çalışmada majör HIV baskılayıcı faktör özelliğine sahip ve CCL5 olarak da adlandırılan başka bir trombosit kinosidini tanımlanmıştır (145). Bu kinosidin CD8<sup>+</sup> T lenfositlerden de salgılanmaktadır. Bu sonuçlar trombosit kaynaklı CXCL4'ün geniş spektrumlu bir HIV-1 inhibitörü olduğunu gösteren raporlar ile tam uyumludur (86).

#### **2.2.9.3. Parazitler ile Trombositlerin Etkileşimi**

Trombositler *Schistosoma mansoni*, mikrofilaryalar, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* ve *Plasmodium vivax* gibi birçok farklı protozoa ile etkileşim göstermektedir. Bu etkenlerle etkileşimde IgE ve trombosit yüzeyindeki IgE reseptörüne ihtiyaç olduğu görülmektedir (91). Trombositlerin protozoal enfeksiyonlara karşı konak savunmasına katkısının antikör bağımlı hücrel sitotoksikite mekanizması ile olduğu ortaya konmuştur (91).

Bir başka çalışmada *Plasmodium falciparum*'a karşı konak savunmasında CXCL4 kinosidininin gerektiği gösterilmiştir (86). Bu kinosidinin enfekte eritrositler içine girişi kemokinler için Duffy antijen reseptörünün (DARC, Fy) varlığı ile mümkündür. CXCL4 spesifik olarak *Plasmodium* ile enfekte eritrositler içinde birikir ve sindirim vakuolünün lizis etkisi ile paraziti hızla öldürür (86, 146).

#### **2.2.9.4. Mantarlar ile Trombositlerin Etkileşimi**

Trombositler ve onların immün savunma fonksiyon ürünleri aynı zamanda *Candida* spp., *Aspergillus* spp. gibi mantarlara karşı da etkilidir (86). İnvaziv fungal

enfeksiyonlardan zigomikoz etkenlerine (*Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp., *Mucor* spp. ve *Absidia* spp.) yönelik yapılmış çalışmalarda da trombositlerin aktive olduktan sonra konidya ve hiflere güçlü bir şekilde adezyon gösterdiği ve granül bağımlı mekanizmalarla fungal büyüme ve yayılımı anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir (147).

İstirahat halindeki trombositlerin zigomikoz etkenlerine ait hifal yapılarla teması sonrası yüzeylerinde CD62P üretimi yapılmaktadır. CD62P,  $\alpha$  granüllerde yer almakta ve aktivasyon sonrası hızla trombosit yüzeyine salınmaktadır. Trombosit yüzey glikoproteinleri adezyon, ligand etkileşimi ve kümelenme safhalarında öncelikli bir rol oynamakta ve farklı trombosit fonksiyonları için de gereklilik arz etmektedir (147).

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarında kan dolaşımında bu mayaların yer değişimi söz konusudur. Mayalar kan dolaşımında fibrinojen, fibronektin, kompleman ve diğer plazma bileşenleri gibi çeşitli proteinlerle etkileşim halindedir. Ayrıca nörofiller ve trombositler gibi kan hücreleriyle de etkileşim halinde oldukları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (148). Maish ve Calderone, *C. albicans*'ın fibrin-platelet tıkaçlara adezyonunu göstermişlerdir (149,150). Yine aynı araştırmacılar *C. albicans*'a ait hücre duvar parçacıklarının trombositleri kümeliendirebildiğini ortaya koymuşlardır (151). Klotz ve ark. *C. albicans*'ın endotele ve subendotelial ekstraselüler matrikse adezyonu üzerine çalışmalar yapmışlar ve maya-trombosit etkileşiminin trombositler kümeliendikten sonra geliştiğini göstermişlerdir (152,153). Ancak bütün bu çalışmalarda araştırmacılar trombosit kümelenmesinin mayaların hücre duvar parçacıkları veya sitozolü ile mümkün olduğunu gösterirken canlı bir maya hücresi ile bu kümelenmeyi gösterememişlerdir. Willcox ve ark. *C. albicans*'ın diğer *Candida* türlerinin aksine trombosit kümelenmesini başaramadığı sonucuna varırken trombositlerin bazı *Candida* türlerini öldürebilirken *C. albicans*'ı öldüremediğini göstermişlerdir. Ancak Yeaman ve ark. trombositlerin *Candida* türlerince aktive edildiğini ve *Candida*'lara karşı aktif olan PMP salgıladıklarını göstermişlerdir (154-156). Robert ve ark. çalışmalarında bir fare modeli kurarak farklı *Candida* türlerinin in vivo trombositleri bağlama yeteneklerini test etmişlerdir. Farelere blastokonidya enjeksiyonu sonrası *C. albicans*'ın kan dolaşımından temizlenme oranının inkübasyonun birinci dakikasında %97 seviyesinde olduğunu buna karşın *C.*

*glabrata*'nın dolaşımdan temizlenme oranının *C. albicans*'dan sekiz kat daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Trombositlerin tüm *Candida* türlerine adezyonu mikroskobik olarak gösterilmiş ve bu durumun trombositlerin aktivasyonuna işaret ettiği kabul edilmiştir. Trombosit adezyonunun morfolojik değişiklik mekanizması ile oluştuğu değerlendirilmiştir (148).



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

“Trombositlerin *Candida albicans* Üzerine Antifungal Etkinliğinin Araştırılması” konulu tez çalışması, deneysel nitelikte bir araştırmadır. Çalışmamızın etik kurul onayı, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’nun 13.03.2017 günü yapılan toplantısında HNEAH-KAEK 2017/KK/24 numarası ile alındı. Çalışmamız Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminden mali destek alınarak yapıldı.

#### 3.1. Kullanılan Cihazlar

- Trombosit santrifüj cihazı (Magellan Autospin Biologic Therapies, Arterioocyte Cellular Therapies, A.B.D.)
- Etüv (EN 500, Nüve, Türkiye)
- McFarland densitometre (Biomerieux, Fransa)
- Vorteks cihazı (NM110, Nüve, Türkiye)
- Kan sayım cihazı (Cell Dyn Sapphire, Abbott Diagnostic, A.B.D.)
- Çalkalayıcı (Thermolyne Maxi Mix III Type 65800, Thermo Fischer Scientific, A.B.D.)
- Tüp santrifüjü (NF 200, Nüve, Türkiye)
- ELISA Mikroplak yıkayıcı (CA-200, CIOM Medical, Çin)
- Otomatik strip yıkayıcı (ELx50, BioTek, A.B.D.)
- ELISA Mikroplak okuyucu (ELx800, BioTek, A.B.D.)
- ELISA Mikroplak vorteksi (MX-M, Dragon Lab, Polonya)

#### 3.2. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri

- Antikoagülan (Kansuk ACD-A 500 ml, Kansuk Laboratuvarı, Türkiye)
- Trombosit santrifüj seti (Magellan Autospin Biologic Therapies, Arterioocyte Cellular Therapies, A.B.D.)
- %10 Kalsiyum glukonat ampul (Calcium Picken Ampul, Adeka İlaç, Türkiye)

- Serum pıhtı aktivasyon tüpü 9 ml (Vacuette®, BD Vacutainer, Plymouth, İngiltere)
- K<sub>3</sub>EDTA tüp 5 ml (BD Vacutainer, Plymouth, İngiltere)
- Siyah burgu kapaklı steril cam tüp (Şişecam, Türkiye)
- Steril plastik konik tüp 50 ml (Fırat Plastik, Türkiye)
- Yuvarlak tabanlı steril cam tüp (Şişecam, Türkiye)
- Sabouraud Dekstroz Agar besiyeri (BesLab, Türkiye)
- Brain Heart Broth (Buyyon) (Merck, Almanya)
- %0,9 İzotonik Sodyum Klorür (Polifarma, Türkiye)
- PBS solüsyonu (ChemBio, Türkiye)
- Pipet 0,5-10 µl (Witeg, Almanya)
- Pipet 20-200 µl (BrandTech, A.B.D.)
- Pipet 100-1000 µl (BrandTech, A.B.D.)
- Filtreli steril pipet ucu 0,1-10 µl (DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen) (AHN, Almanya)
- Filtreli steril pipet ucu 1-200 µl (DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen) (AHN, Almanya)
- Filtreli steril pipet ucu 100-1000 µl (DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen) (AHN, Almanya)
- Steril öze (Looplast, LP, İtalya)
- Büyüteç (Baloo, 8711G, Türkiye)

### 3.3. Kullanılan ELISA Kitleri

- Human PF-4 (Elabscience, Çin)
- Human TMSB4 (Elabscience, Çin)
- Human IL-8 (Invitrogen, A.B.D.)

### 3.4. Örnek Kabulü

Çalışmamızda, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Sultan Abdülhamid Han Eğitim ve Araştırma Hastanesinde çalışmaya katılmak isteyen kan bağışçı seçim kriterlerine uygun 9 gönüllüden 50'şer ml kan alındı. Elde edilen Trombositten Zengin Plazma (TZP)'nin *C. albicans* ATCC 10231 standart suşu üzerine antifungal etkinliğinin gösterilmesi ve bu etkinlikte rol oynadığı düşünülen kemokin, kinosidinlerin tespiti

amacı ile çalışma, Sultan Abdülhamid Han Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

### **3.5. Çalışmaya Alınma Kriterleri**

Ulusal kan ve kan ürünleri rehberindeki kan bağışçısı seçim kriterlerine uygun bağışçı adaylarından kan örnekleri alındı. Çalışma süresi içerisinde bağışçı adaylarında herhangi bir hastalığı olan veya ilaç kullananlar çalışma dışı bırakıldı.

Tüm çalışma boyunca tek *C. albicans* ATCC 10231 suşu canlandırılarak kullanıldı.

### **3.6. Yöntem**

Çalışmaya katılan dokuz gönüllüden elde edilen TZP ve kontrol grubu amacıyla da tampon solüsyonunun (Phosphate buffered saline, PBS) *C. albicans* ATCC 10231 suşunun  $10^3$  koloni oluşturan birim (kob)/ml ve  $10^4$  kob/ml farklı konsantrasyonlarındaki antifungal etkinlikleri ve bu etkiyi ne kadar süre ile devam ettirebildikleri araştırılmak istendi. Aynı zamanda bu etkiden sorumlu olabileceği düşünülen kemokin, kinosidinlerin de değişimi ELISA yöntemiyle ölçüldü.

### **3.7. Trombositten Zengin Plazma (TZP)**

TZP elde edilmesi amacıyla Magellan PRP™ kiti içerisinde bulunan 60 ml enjektöre 6 ml ACD-A eklendi. Bu enjektör ile bağışçıların brakial veninden 54 ml tam kan çekildi. Toplamda 60 ml ACD-A karışımlı tam kan tam otomatize kapalı sistemli MagellanPRP™ (Arteriocyte Cellular Therapies, A.B.D.) cihazına bağlandı (Şekil 3.1.) ve 3 ml TZP elde edildi.

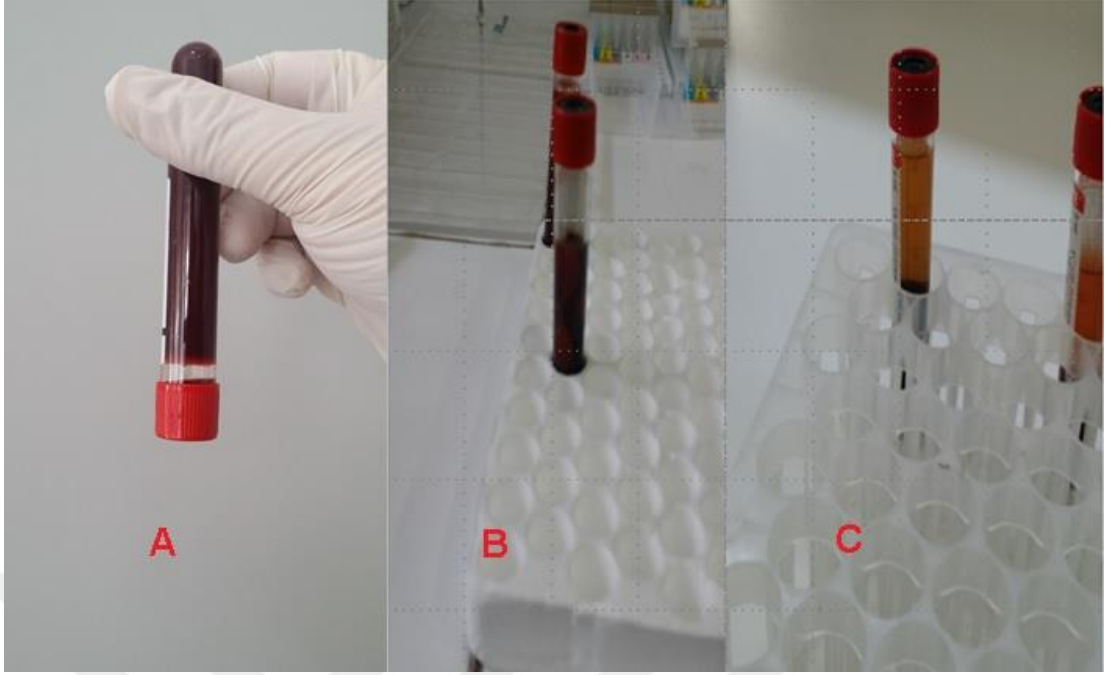


**Şekil 3.1.** MagellanPRP™ Tam Otomatize Trombosit Santrifüjü.

### **3.8. Otolog Trombin Elde Edilmesi**

Trombin elde edilmesi amacıyla her bir gönüllüden yaklaşık 9 ml tam kan Vacuette® serum pıhtı aktivasyon tüpüne (BD Vacutainer, Plymouth, İngiltere) alındı. Her bir tüp içine 1 ml %10 Kalsiyum Glukonat (Calcium Picken Ampul, Adeka İlaç, Türkiye) ilave edildi. Oda ısısında yaklaşık 10-15 dakikada pıhtı oluşumu gerçekleşti (Şekil 3.2.A.). Bu pıhtı içeren tüp elde sert bir şekilde 1-2 dakika çalkalanıp pıhtı parçalandı (Şekil 3.2.B.). Kısmen parçalanmış pıhtı vorteks cihazı (NM110, Nüve, Türkiye) ile bir dakika süre ile homojenizasyon amacıyla vortekslendi.

Sonrasında 3 dakika süre ile 3000 rpm devirde tüpler santrifüj edildi (NF 200, Nüve, Türkiye yukarıda Türkiye denmiş). Şekilli elemanların tüpün dibine çökmesini müteakip üst kısımdan trombin içeren serum elde edildi (Şekil 3.2.C.).



Şekil 3.2. Otolog Trombin Elde Edilme Basamakları.

### 3.9. Çalışma Gruplarının Hazırlanması

Çalışma gruplarının hazırlanabilmesi için ilk aşamada *C. albicans* ATCC 10231 suşu CLSI (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü, A.B.D.) M44-A2 dokümanında belirtilen inokulum hazırlama prosedürü doğrultusunda Sabouraud dekstroz agar (SDA) (BesLab, Türkiye) üzerine ekilerek 35°C’de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plak üzerinde belirgin olan kolonilerden 5 tanesi alınarak 5ml steril %0,9 izotonik sodyum klorür (SF) içinde süspanse edildi. Süspansiyon 15 sn süreyle vortekslenerek homojenize edildi.

McFarland densitometre (Biomérieux, Fransa) kullanılarak, tüplerin bulanıklık değeri steril %0,9 SF ile dilüe edilerek 0,5 McFarland olacak şekilde ayarlandı. 0,5 McFarland’lık *C. albicans* stok maya süspansiyonu yaklaşık olarak  $1 \times 10^6$  kob/ml maya hücresi içermektedir.

Dilüsyon işlemleri sonunda son konsantrasyonları  $1 \times 10^4$  kob/ml ve  $1 \times 10^3$  kob/ml olacak iki ayrı grup hazırlandı. Bunun için  $1 \times 10^6$  kob/ml içeren stok maya süspansiyonundan 1 ml alınarak 9 ml PBS içeren tüpe eklenir. Böylelikle sonraki aşamalarda kullanılmak üzere  $1 \times 10^5$  kob/ml maya içeren süspansiyon hazırlanmış oldu.

Çalışmamızda 3 grup oluşturuldu (Tablo 3.1.). Bunlar sırası ile;



1.  $1 \times 10^4$  kob/ml maya içerikli Trombositten Zengin Plazma (TZP) Grubu
2.  $1 \times 10^3$  kob/ml maya içerikli Trombositten Zengin Plazma (TZP) Grubu
3.  $1 \times 10^3$  kob/ml maya içerikli Kontrol (PBS) Grubu

**Tablo 3.1.** Çalışma Grupları.

	<b>TZP Grubu</b>	<b>PBS (Kontrol) Grubu</b>
<b>Buyyon</b>	700 $\mu$ l	700 $\mu$ l
<b><i>C. albicans</i></b> ( $1 \times 10^6$ )( $1 \times 10^5$ )	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
<b>Trombin</b>	40 $\mu$ l	40 $\mu$ l
<b>TZP</b>	160 $\mu$ l	-
<b>PBS</b>	-	160 $\mu$ l

**TZP:** Trombositten zengin plazma, **PBS:** Fosfatlı tampon solüsyonu

### 3.10. Trombositten Zengin Plazma (TZP) Grubu

Koloni sayıları ayarlanmış ( $1 \times 10^6$  ve  $1 \times 10^5$  kob/ml) 100  $\mu$ l *C. albicans* ağız kapaklı cam çalışma tüplerine eklendi. Bunun üzerine 700  $\mu$ l buyyon, 160  $\mu$ l TZP son olarak 40  $\mu$ l trombin eklendi (Tablo 3.1.). Çalışma tüplerinde 10x daha dilüsyon gerçekleştiğinden son maya konsantrasyonu  $1 \times 10^5$  ve  $1 \times 10^4$  kob/ml haline geldi.

Tüpler 30°C 'de etüvde 200 rpm'de çalışan ajitatör (Thermolyne Maxi Mix III Type 65800, ThermoFischerScientific, A.B.D.) üzerinde inkübasyona kaldırıldı (Şekil 3.3.). Daha önceden belirlediğimiz saatlerde (1., 2., 4., 8., 16. saat) tüpler kontrol ekimleri için çıkarıldı. Ekim öncesi tüpler tekrar vorteksenerek homojenizasyonları sağlandı. Ekimler sırasında 10  $\mu$ l örnek filtreli steril pipet ucu (0,1-10  $\mu$ l, AHN, Almanya) kullanılarak 90  $\mu$ l steril %0,9 SF ile steril boş petri üzerinde ucu) p karıştırıldı.

Bu 100  $\mu$ l 'lik ( $10^4$  ve  $10^3$  son *C. albicans* konsantrasyonları) karışım SDAk yüzeyine yayıldı. Böylece başlangıç maya konsantrasyonları  $10^3$  ve  $10^4$  olan iki trombositten zengin plazma grubu oluşturulmuş oldu (TZP- $10^3$  ve TZP- $10^4$ ). 30°C'de 18-24 saatlik inkübasyon sonrası koloniler sayım için değerlendirildi.



**Şekil 3.3.** Otolog trombin,-TZP/PBS (Kontrol Grubu) ve *C. albicans* Karışımının Etüvde Bekletilmesi ve Çalkalanması.

### **3.11. Kontrol (Phosphate buffered saline, PBS) Grubu**

100 µl  $1 \times 10^5$  kob/ml *C. albicans* çalışma tüplerine eklendi. Bunun üzerine 700 µl buyyon, 160 µl PBS son olarak 40 µl trombin eklendi (Tablo 3.1.). Çalışma tüplerinde 10x daha dilüsyon gerçekleştiğinden son maya konsantrasyonu  $1 \times 10^4$  kob/ml haline geldi.

Tüpler  $30^\circ\text{C}$ 'de etüvde 200 rpm'de çalışan ajitator üzerinde inkübasyona kaldırıldı. Daha önceden belirlediğimiz saatlerde (1., 2., 4., 8., 16. saat) tüpler kontrol ekimleri için çıkarıldı (Şekil 3.3.). Ekim öncesi tüpler tekrar vorteksenerek homojenizasyonları sağlandı. Ekimler sırasında 10 µl örnek, 90 µl steril %0,9 SF ile karıştırıldı (son konsantrasyon  $10^3$  kob/ml elde edildi) ve 100 µl'lik tüm hacim SDAk yüzeyine yayıldı. Böylece başlangıç maya konsantrasyonu  $10^3$  olan kontrol grubu oluşturulmuş oldu (PBS-kontrol).  $30^\circ\text{C}$ 'de 18-24 saatlik inkübasyon sonrası koloniler sayım için değerlendirildi.

### **3.12. Kemokin, Kinosidinlerin ELISA Metodu ile Ölçülmesi**

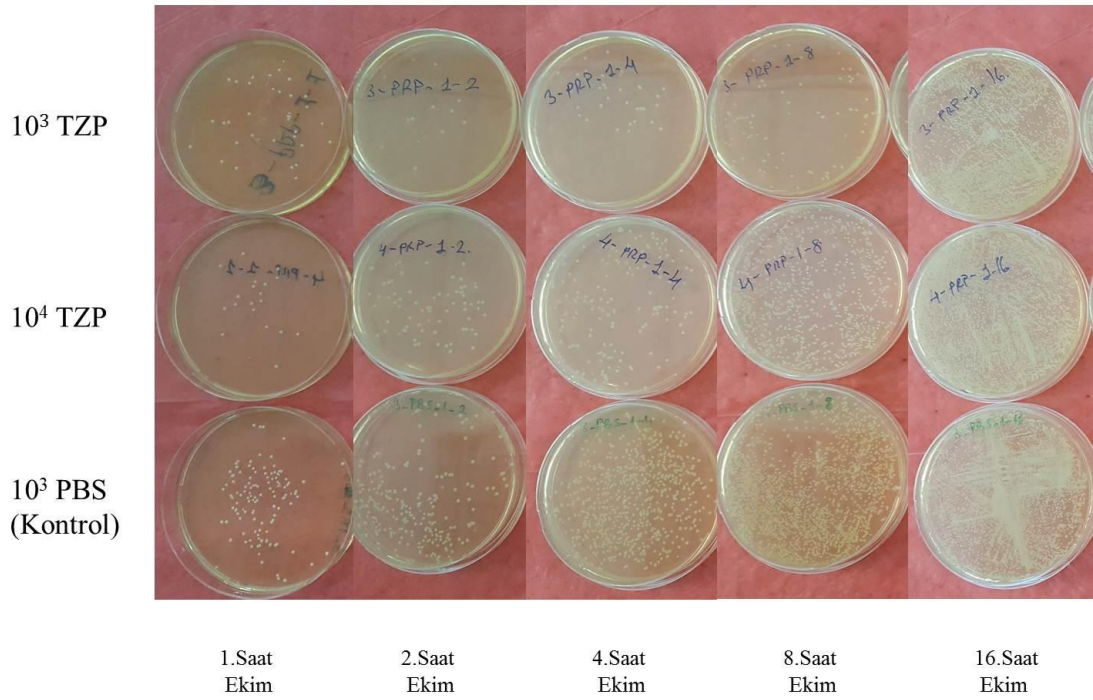
*C. albicans* üzerine antifungal etkinliği araştırılan TZP'nin bu etkinliğinden sorumlu olabileceği düşünülen üç farklı kemokin, kinosidin daha önceden belirlediğimiz saatlerde (1., 2., 4., 8., 16. saat) tüpler kontrol ekimleri için etüvden çıkarıldığında eş zamanlı olarak ELISA yöntemiyle üretici firma talimatları

doğrultusunda her defasında değerlendirildi. Ölçümü yapılan parametreler sırasıyla; Human PF-4 (Elabscience, Çin), Human TMSB4 (Elabscience, Çin), Human IL-8 (Invitrogen, A.B.D.) idi. Belirlenen ekim saatlerinde ELISA testleri; ELISA Mikroplak yıkayıcı (CA-200, CIOM Medical, Çin), Otomatik strip yıkayıcı (ELx50, BioTek, A.B.D.), ELISA Mikroplak vorteksi (MX-M, Dragon Lab, Polonya) ve ELISA Mikroplak okuyucu (ELx800, BioTek, A.B.D.) kullanılarak çalışıldı. Sonuçlar bilgisayar sistemine kaydedildi.

### 3.13. Üreme Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Etüv içinde 30°C’de 18-24 saatlik inkübasyon süresi bitiminde SDA’daki üremeler sayıldı (Şekil 3.4.).

1 numaralı gönüllüye ait plak görüntüleri



Şekil 3.4. Bir Gönüllüye Ait Her 3 Çalışma Grubunun SDA Plaklarında Ekim Zamanı ve Gruplandırılması.

### 3.14. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizlerde www.e-picos.com (NY, New York yazılımı) ve MedCalc istatistik paket programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistik değerleri medyan, 1. çeyreklik, 3. çeyreklik ve minimum-maksimum olarak verildi. Çalışmaya dahil

edilen denek sayısının 30'dan az ve 9 olması nedeniyle normallik testi yapılmadan non-parametrik testler kullanılmıştır. Non-parametrik testlerde, iki bağımlı grup ortalama sıralarını karşılaştırmak için "Wilcoxon Signed Ranks Test" kullanılmıştır. Non-parametrik testlerde, ikiden fazla bağımlı grup ortalama ranklarını karşılaştırmak için "Friedman test" kullanılmıştır. Verilerin istatistiksel açıdan anlamlılık düzeyi  $p<0,05$  olarak alındı.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Gönüllülere Ait Tam Kan Değerleri

Gönüllü bağışçıların tam kan (TK) analizinde medyan Beyaz Küre (WBC) sayısı;  $7,07 \times 10^3/\mu\text{l}$  iken medyan Trombosit (PLT) sayısı  $244 \times 10^3/\mu\text{l}$  olarak gözlemlendi.

### 4.2. TZP Değerleri

Tam kan ve TZP'ye ait beyaz küre, nötrofil, lenfosit ve trombosit sayıları Tablo 4.1.'de verilmiştir. TZP'de beklendiği üzere trombosit sayısı artmışken, beraberinde beyaz küre sayısında arttı.

Trombositten Zengin Plazma (TZP)'deki medyan Beyaz Küre (WBC) sayısı;  $49,4 \times 10^3/\mu\text{l}$ , medyan Trombosit (PLT) sayısı  $2165 \times 10^3/\mu\text{l}$  olarak saptandı. Bağışçıların TZP özellikleri Tablo 4.1.'de özetlenmiştir. TZP'deki trombosit ve WBC verimliliğinde yaklaşık 9 kat artış saptandı.

**Tablo 4.1. Gönüllü Başışçıların Tam Kan (TK) ve Trombositten Zengin Plazma (TZP) Değerleri.**

	<b>BAĞIŞÇI</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>TK</b>	RBC (x10 <sup>6</sup> /μl)	5,75	5,24	5,11	4,13	3,75	5,08	4,29	4,83	5,27
	HGB (g/dl)	16,90	15,90	16,10	13,00	11,00	16,40	12,60	16,00	15,10
	HCT (%)	46,10	43,40	43,70	36,70	30,60	44,60	35,00	43,60	41,20
	MCV (fl)	80,20	82,80	85,60	88,70	81,60	87,80	81,50	90,30	78,20
	MCH (pg)	29,40	30,40	31,60	31,50	29,20	32,20	29,20	33,10	28,60
	MCHC (g/dl)	36,60	36,70	36,90	35,50	35,90	36,70	35,90	36,70	36,50
	RDW (%)	11,70	12,20	12,40	12,10	13,90	11,20	12,70	11,80	11,40
	<b>PLT (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	<b>185,00</b>	<b>224,00</b>	<b>194,00</b>	<b>255,00</b>	<b>254,00</b>	<b>229,00</b>	<b>255,00</b>	<b>244,00</b>	<b>254,00</b>
	MPV (fl)	9,38	8,79	8,37	8,63	10,10	7,39	8,58	8,11	8,48
	<b>WBC (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	<b>5,71</b>	<b>7,54</b>	<b>7,71</b>	<b>7,74</b>	<b>7,07</b>	<b>6,53</b>	<b>6,36</b>	<b>7,25</b>	<b>5,70</b>
	NEU (x10 <sup>3</sup> /μl)	3,60	3,49	4,17	4,81	3,80	3,25	4,28	4,59	2,44
	LYM (x10 <sup>3</sup> /μl)	1,77	3,73	2,88	2,55	2,51	2,84	1,68	2,12	2,62
	MONO (x10 <sup>3</sup> /μl)	0,24	0,13	0,44	0,15	0,57	0,25	0,19	0,35	0,54
	EOS (x10 <sup>3</sup> /μl)	0,08	0,18	0,18	0,22	0,13	0,18	0,21	0,18	0,07
	BASO (x10 <sup>3</sup> /μl)	0,02	0,01	0,03	0,01	0,06	0,02	0,01	0,01	0,03
	NEU (%)	63,00	46,40	54,10	62,20	53,70	49,80	67,20	63,30	42,70
	LYM (%)	31,00	49,50	37,40	33,00	35,60	43,40	26,40	29,30	46,00
	MONO (%)	4,27	1,72	5,73	1,89	8,11	3,81	2,94	4,82	9,45
	EOS (%)	1,45	2,35	2,37	2,80	1,81	2,71	3,29	2,47	1,30
	BASO (%)	0,33	0,09	0,40	0,16	0,78	0,26	0,11	0,19	0,51
<b>TZP</b>	RBC (x10 <sup>6</sup> /μl)	1,97	1,24	1,35	2,67	2,90	2,71	2,37	2,61	2,31
	HGB (g/dl)	5,00	3,75	3,34	7,16	6,01	8,26	6,22	8,08	6,10
	HCT (%)	16,10	10,30	10,10	24,40	20,60	24,10	19,80	24,20	18,20
	MCV (fl)	81,70	82,90	74,80	91,20	71,10	89,00	83,40	92,70	79,10
	MCH (pg)	25,30	30,20	24,80	26,80	20,70	30,50	26,20	30,90	26,50
	MCHC (g/dl)	31,00	36,50	33,20	29,40	29,10	34,30	31,50	33,40	33,50
	RDW (%)	12,10	12,20	32,80	12,80	36,60	12,00	14,80	11,90	12,20
	<b>PLT (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	<b>1900,00</b>	<b>2698,00</b>	<b>1716,00</b>	<b>2040,00</b>	<b>1236,00</b>	<b>2786,00</b>	<b>3796,00</b>	<b>2526,00</b>	<b>2165,00</b>
	MPV (fl)	9,76	8,73	8,12	9,40	10,30	7,71	8,70	8,33	8,42
	<b>WBC (x10<sup>3</sup>/μl)</b>	<b>34,50</b>	<b>33,20</b>	<b>39,20</b>	<b>78,60</b>	<b>63,20</b>	<b>82,80</b>	<b>38,50</b>	<b>70,80</b>	<b>49,40</b>
	NEU (x10 <sup>3</sup> /μl)	7,91	5,51	9,26	29,30	15,00	28,60	6,88	38,40	19,20
	LYM (x10 <sup>3</sup> /μl)	21,40	24,90	24,20	34,90	38,40	43,70	23,70	25,30	24,10
	MONO (x10 <sup>3</sup> /μl)	4,87	2,52	5,38	13,50	9,07	9,28	7,47	6,37	5,78
	EOS (x10 <sup>3</sup> /μl)	0,08	0,11	0,21	0,53	0,31	0,93	0,29	0,40	0,30
	BASO (x10 <sup>3</sup> /μl)	0,21	0,13	0,17	0,32	0,40	0,29	0,18	0,27	0,14
	NEU (%)	22,90	16,60	23,60	37,30	23,80	34,60	17,80	54,30	38,70
	LYM (%)	62,10	75,10	61,70	44,50	60,70	52,80	61,60	35,80	48,70
	MONO (%)	14,10	7,59	13,70	17,20	14,40	11,20	19,40	9,00	11,70
	EOS (%)	0,24	0,33	0,54	0,68	0,49	1,12	0,74	0,57	0,61
	BASO (%)	0,61	0,40	0,45	0,41	0,63	0,35	0,46	0,38	0,27

### 4.3. Gönüllülere Ait Tam Kan ve TZP Değerlerinin İstatistiksel Analizi

Çalışmaya katılan gönüllülerin tam kanlarında ölçülen beyaz küre, nötrofil, lenfosit ve trombosit sayıları; TZP'den daha düşük olarak tespit edildi. Tam kan değerleri ile TZP değerleri arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p < 0,05$ ).

**Tablo 4.2.** Gönüllü TK ve TZP Gruplarındaki Değerlerin Analizi.

Hücre tipi	TK		TZP	
	Medyan(%25-%75)	Min-Max	Medyan(%25-%75)	Min-Max
Beyaz küre sayısı ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	7,07(6,035-7,625)	5,70-7,74	49,4(36,5-74,7)	33,20-82,80
Nötrofil sayısı ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	3,80(3,37-4,435)	2,44-4,81	15(7,395-28,95)	5,51-38,40
Lenfosit sayısı ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	2,55(1,945-2,86)	1,68-3,73	24,9(23,9-36,65)	21,40-43,70
Trombosit sayısı ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	244(209-254)	185-255	2165(1808-2742)	1236-3796

Non-parametrik testlerde, iki bağımlı grup sıralarını karşılaştırmak için "Wilcoxon Signed Ranks Test" kullanılmıştır.

Bütün hücre tiplerine ait değerler her iki grup için karşılaştırıldığında wilcoxon istatistik değeri  $z = -2,666$  olarak saptanmış ve buna karşılık gelen p değeri olan  $0,008 < 0,05$  olduğundan bütün hücre tipleri ortalama sıraları arasında anlamlı farklılık saptanmıştır.

### 4.4. Koloni Sayımı

Koloni sayımları SDA plaklarına yapılan ekimlerin 18-24 saatlik inkübasyonu sonrasında büyüteç (Baloo, 8711G, Türkiye) yardımıyla yapıldı. Sayılan kolonilerin karışıklığa yol açmaması için üzerleri steril tek kullanımlık özenin sivri tarafı ile çizildi. Kolonilerin sayılabileceği üst değer 500 olarak belirlendi. Koloni sayısı 500 ve üzerinde olan tüm değerler 500 olarak kabul edildi.

$10^3$  maya konsantrasyonuna sahip TZP grubunun ( $TZP-10^3$ ) saatlere göre üreyen koloni medyan değerleri sırasıyla 1. saat için 3, 2. saat için 7, 4. saat için 34, 8. saat için 143 ve son olarak 16. saat için 500 olarak bulundu (Tablo 4.3.).

$10^4$  maya konsantrasyonuna sahip TZP grubunun ( $TZP-10^4$ ) saatlere göre üreyen koloni medyan değerleri sırasıyla 1. saat için 19, 2. saat için 48, 4. saat için 166, 8. saat için 500 ve son olarak 16. saat için 500 olarak bulundu (Tablo 4.3.).

$10^3$  maya konsantrasyonuna sahip PBS (kontrol) grubunun saatlere göre üreyen koloni medyan değerleri sırasıyla 1. saat için 242, 2. saat için 280, 4. saat için 500, 8. saat için 500 ve son olarak 16. saat için 500 olarak bulundu (Tablo 4.3.).

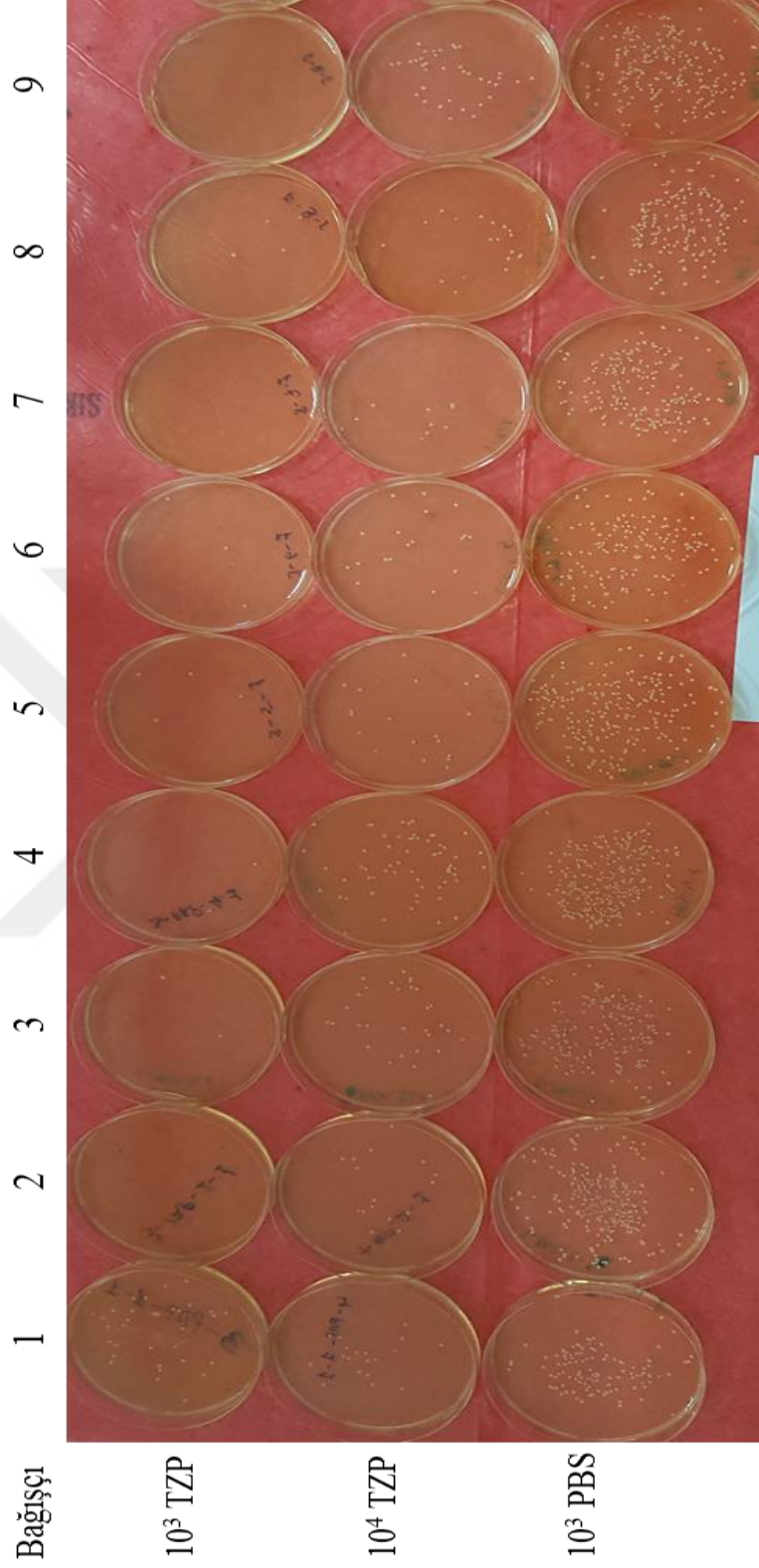
Bütün bağışçılara ait her saatlik üreme sonuçları Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.** Üç Çalışma Grubuna Ait 18-24. Saat Sonunda SDA Plaklarında Üreyen Koloni Sayıları.

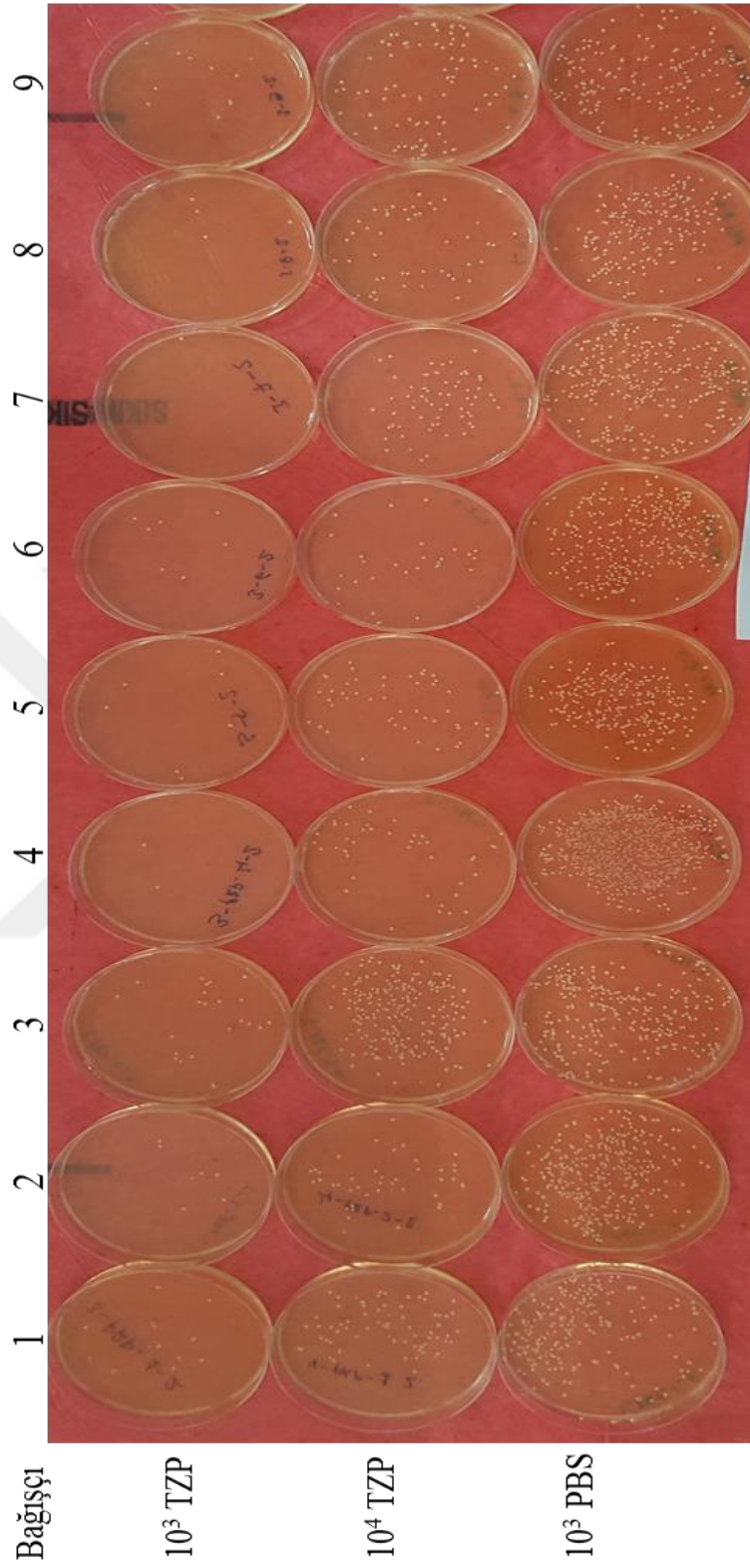
		Bağışçı	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Medyan
S o ü n r u e ç m l e a r ı	$10^3$ TZP	1.Saat	35	0	4	2	4	3	0	5	0	3
		2.Saat	12	7	23	2	8	7	1	4	11	7
		4.Saat	34	15	60	76	29	28	34	20	65	34
		8.Saat	93	103	253	134	100	191	185	143	243	143
		16.Saat	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
	$10^3$ PBS	1.Saat	119	298	197	321	242	274	208	202	255	242
		2.Saat	243	273	300	500	280	353	341	224	194	280
		4.Saat	500	500	500	500	500	500	500	482	500	500
		8.Saat	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
		16.Saat	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
	$10^4$ TZP	1.Saat	19	16	30	64	20	19	10	19	40	19
		2.Saat	74	43	150	43	48	31	69	48	98	48
		4.Saat	167	166	412	198	55	157	152	141	316	166
		8.Saat	500	500	500	500	413	500	500	500	500	500
		16.Saat	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500

**TZP:** Trombositten zengin plazma, **PBS:** Fosfatlı tampon solüsyonu.

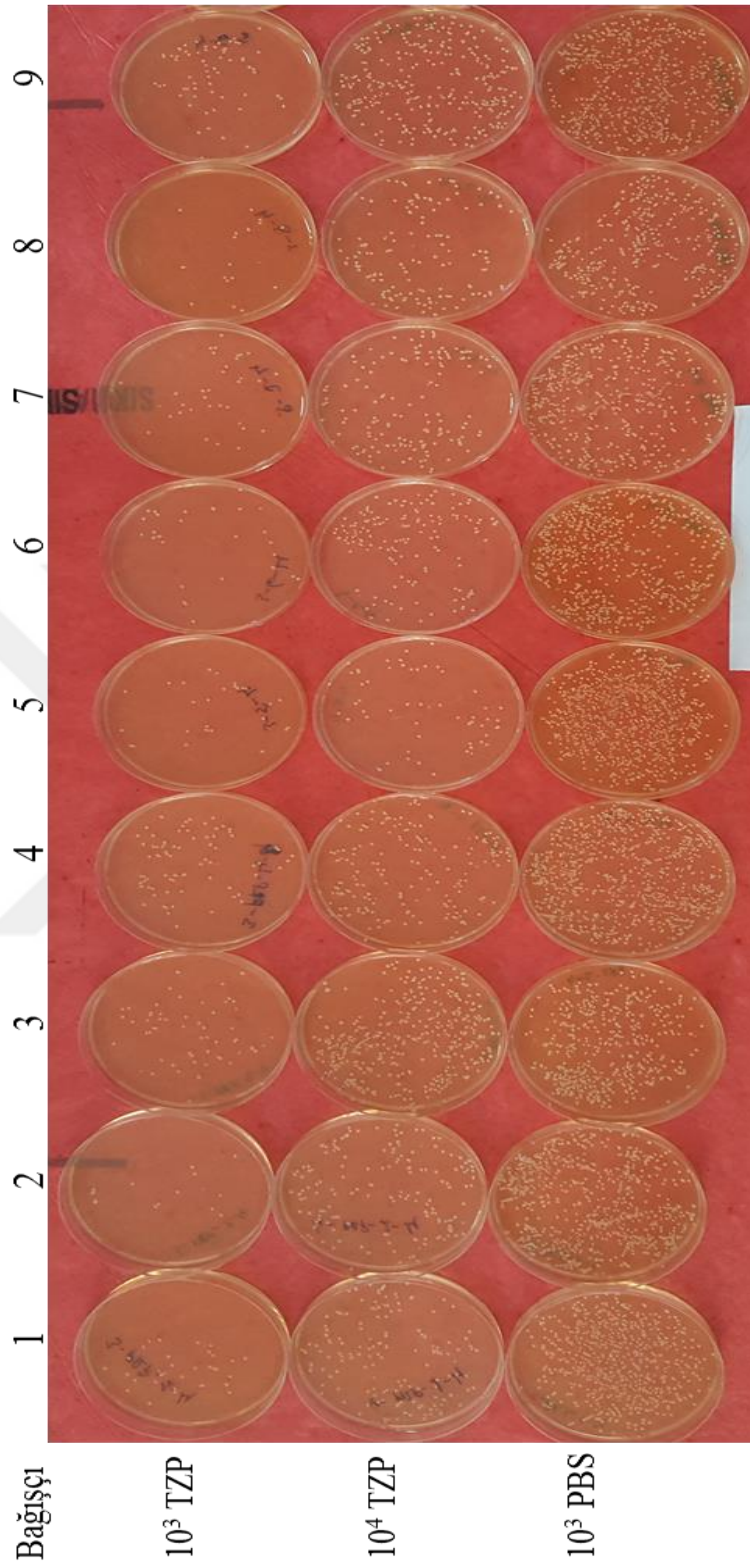




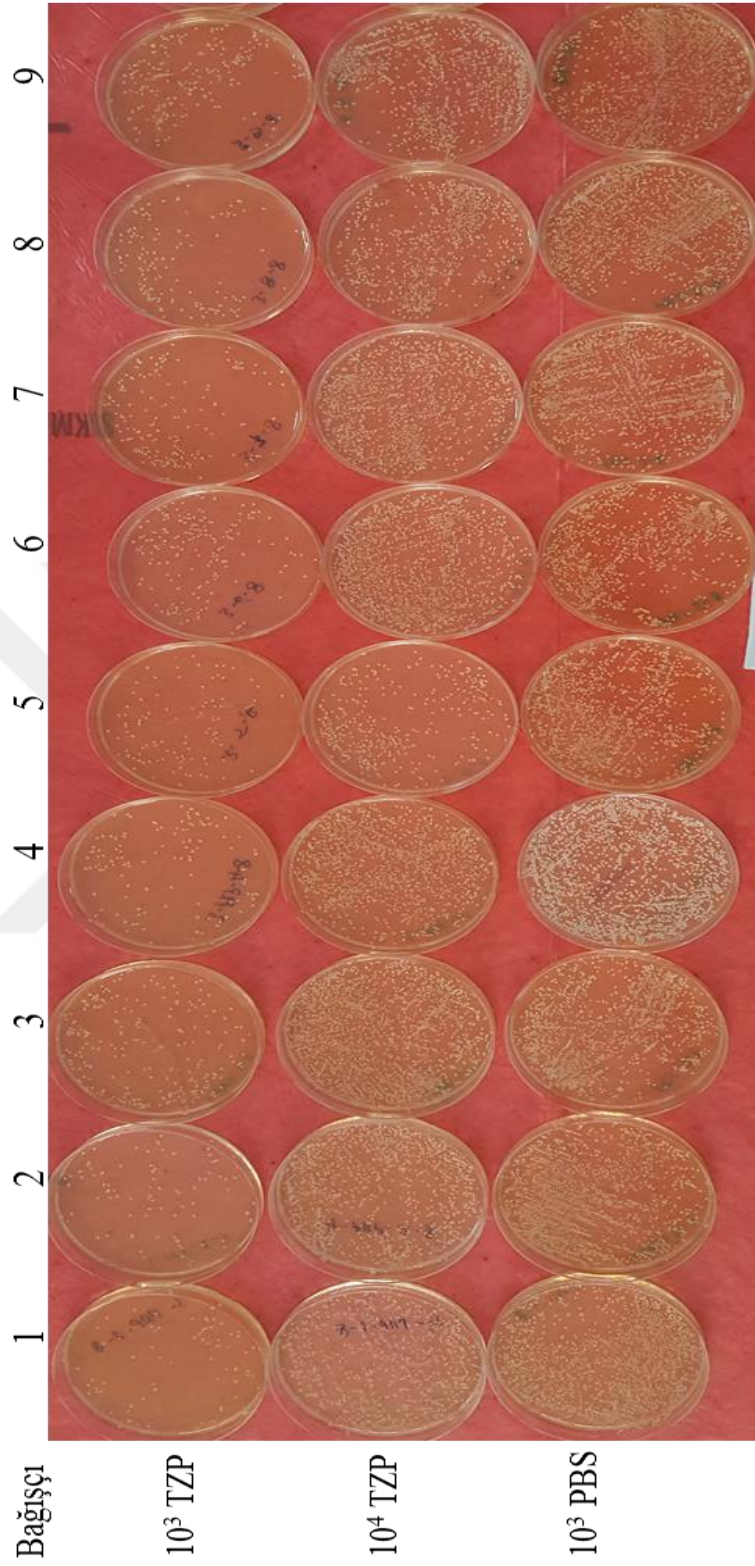
**Şekil 4.1.** 1-9. Bağışçılara Ait İki Farklı TZP Grubunun *Candida albicans* Üzerine 1. Saat Etkinliğini Gösteren Koloni Sayım Plakları.



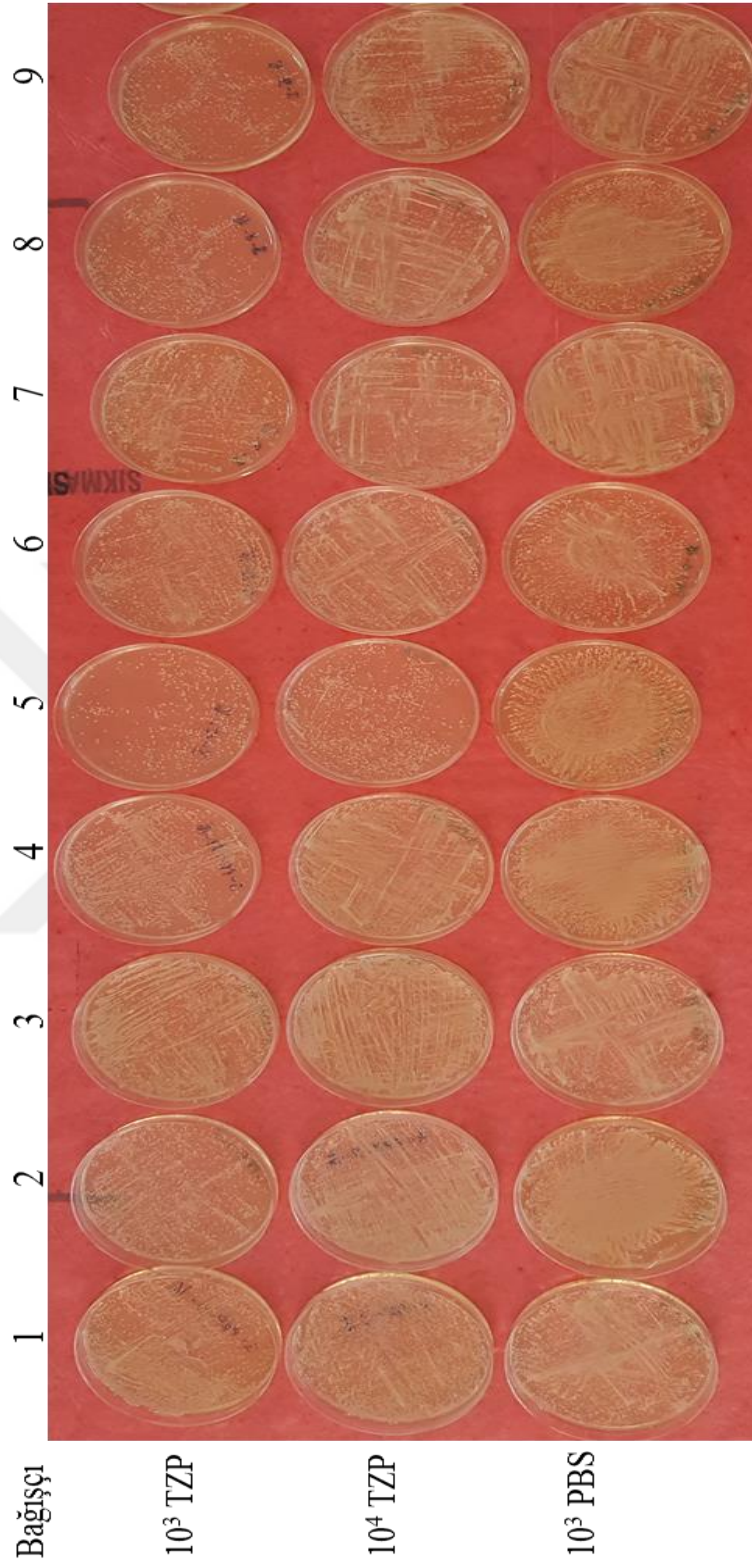
**Şekil 4.2.** 1-9. Bağışçılara Ait İki Farklı TYP Grubunun *Candida albicans* Üzerine 2. Saat Etkinliğini Gösteren Koloni Sayım Plakları.



**Şekil 4.3.** 1-9. Bağışçılara Ait İki Farklı TYP Grubunun *Candida albicans* Üzerine 4. Saat Etkinliğini Gösteren Koloni Sayım Plakları.



**Şekil 4.4.** 1-9. Bağışçılara Ait İki Farklı TYP Grubunun *Candida albicans* Üzerine 8. Saat Etkinliğini Gösteren Koloni Sayım Plakları.



**Şekil 4.5.** 1-9. Bağışçılara Ait İki Farklı TZP Grubunun *Candida albicans* Üzerine 16. Saat Etkinliğini Gösteren Koloni Sayım Plakları.

#### 4.5. TZP ve Kontrol Gruplarında Üremelerin Karşılaştırılması

Trombositten zengin plazma ve PBS içeren kontrol grupları arasında  $1 \times 10^3$  kob/ml *Candida albicans* içeren tüpler ajitatör üzerinde  $30^\circ\text{C}$ 'lik etüvde bekletildikten sonra çalışmanın 1., 2., 4., 8. ve 16. saatlerinde SDA plaklarına ekim yapıp, 18-24 saatlik inkübasyon sonrası değerlendirildiğinde;

TZP grubunda 1., 2, 4, 8 ve 16. saatlerde üreyen koloni sayılarında PBS-kontrol grubu olan ile i kıyaslandığında 8. saatte dahil olmak üzere fark istatistiksel olarak anlamlı iken ( $p=0,008 < 0,05$ ), 16. saatte bu farkın eşitlenerek istatistiksel anlamlılığın ortadan kalktığı ( $p=1 > 0,05$ ) yani trombositlerin antifungal etkinliğini kaybettiği görüldü (Tablo 4.4.).

**Tablo 4.4.**  $10^3$  Maya Konsantrasyonuna Sahip TZP ve PBS Gruplarında Üreyen Koloni Sayılarının Saatlere Göre Karşılaştırma İstatistikleri.

N=9			
$10^3$ TZP-PBS		N	P değeri
<b>1.saat-1.saat</b>			
	Negatif Ranks	0	0,008*
	Pozitif Ranks	9	
	Eşit Ranks	0	
<b>2.saat-2.saat</b>			
	Negatif Ranks	0	0,008*
	Pozitif Ranks	9	
	Eşit Ranks	0	
<b>4.saat-4.saat</b>			
	Negatif Ranks	0	0,008*
	Pozitif Ranks	9	
	Eşit Ranks	0	
<b>8.saat-8.saat</b>			
	Negatif Ranks	0	0,008*
	Pozitif Ranks	9	
	Eşit Ranks	0	
<b>16.saat-16.saat</b>			
	Negatif Ranks	0	1
	Pozitif Ranks	0	
	Eşit Ranks	9	

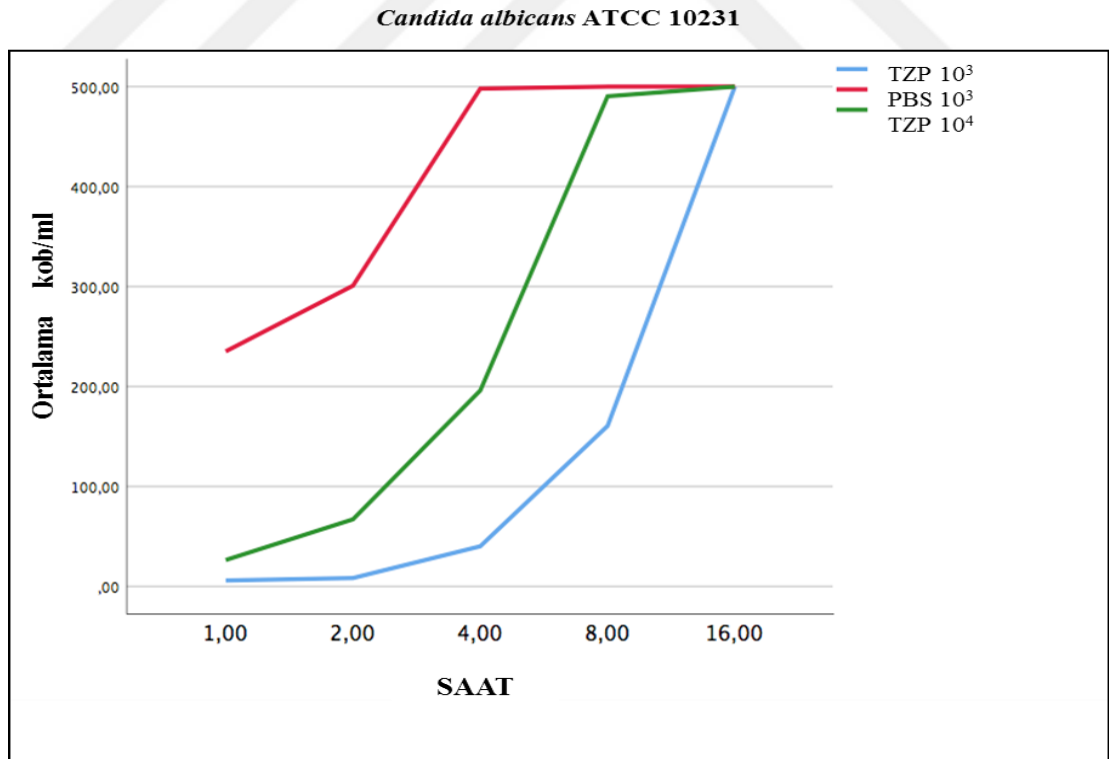
Non-parametrik testlerde, iki bağımlı grup sıralarını karşılaştırmak için “Wilcoxon Signed Ranks Test” kullanılmıştır.

TZP grubunda 1., 2, 4, 8 ve 16. saatlerde üreyen kolonilerin PBS-kontrol grubu ile i kıyaslandığında ortalama olarak 8. saatte halen etkili olduğu, 16. saatte ise trombositlerin antifungal etkinliğini kaybettiği görüldü (Tablo 4.5.).

$10^4$  kob/ml maya konsantrasyonu içeren çalışma grubunda TZP'nin antifungal etkinliğinin  $10^3$  kob/ml PBS-kontrol grubu ile i kıyaslandığında 4. saatte devam ettiği, 8. saatte ise bu antifungal etkinliğin çok azaldığı, 16. saatte ise bu etkinliğin ortadan kalktığı görülmüştür (Tablo 4.5.). Etkinlikteki bu düşüşün maya konsantrasyonundaki fazlalıktan ötürü olabileceği değerlendirildi.

$10^3$  kob/ml ve  $10^4$  kob/ml maya konsantrasyonu içeren TZP grupları üreme ortalamaları açısından değerlendirildiğinde ise 1., 2., 4. ve 8. saatteki üreme sayıları TZP  $10^3$  grubunda daha azdı. Bu üreme ortalamalarındaki düşüklük maya konsantrasyonuna bağlandı. 16. saatte ise hangi konsantrasyonda olursa olsun üreme ortalamalarının aynı olduğu görüldü (Tablo 4.5.).

**Tablo 4.5.** TZP ve PBS Gruplarında Farklı Saatlerdeki Üreme Ortalamaları.



#### 4.6. TZP ve Kontrol Grupları ile *C. albicans* Üremesi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

$10^3$  kob/ml maya konsantrasyonuna sahip TZP ve PBS-kontrol gruplarının *C. albicans* üremesi üzerine etkisi değerlendirildiğinde 1., 2., 4. ve 8. saatte üreyen koloni sayısının TZP'li grupta daha az olduğu tespit edildi. İki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ( $p < 0,05$ ) (Tablo 4.6.).

Her iki grubun 16. saatteki üreme üzerine etkisi istatistiksel olarak birbirinden farklı değildi.

**Tablo 4.6.** TZP ve Kontrol Grupları ile *Candida albicans* Üremesi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi.

	<i>Candida albicans</i> Üreme Ortalamaları				
	1. saat (Ort±SS)	2. saat (Ort±SS)	4. saat (Ort±SS)	8. saat (Ort±SS)	16. saat (Ort±SS)
<b><math>10^3</math> TZP grubu</b>	5,8±11	8,3±6,6	40,1±21,4	160,5±60,6	500±0
<b>PBS-kontrol grubu</b>	235,1±61,2	300,8±90,7	498±6	500±0	500±0

**TZP:** Trombositten zengin plazma, **PBS:** Fosfatlı tampon solüsyonu.

#### 4.7. TZP ve Kontrol Grupları Üreme Sonuçları ile ELISA Testlerinin Ölçümleri Arasındaki İlişkilerin İncelenmesi

$10^3$  kob/ml ve  $10^4$  kob/ml maya konsantrasyonu içeren TZP ve PBS-kontrol grupları ile ELISA testlerinin her bir parametre için değerlendirme sonuçları aşağıdaki gibidir.

##### 4.7.1. Timosin- $\beta$ 4 (TMSB4)

PBS-kontrol grubunda TMSB4'ün 1., 2., 4., 8. ve 16. saatlerdeki ELISA sonuçları incelendiğinde 1. saatte ( $140,5 \pm 22,2$ ) en yüksek değere ulaştığı saptandı. 16. saatte ise bu değer minimuma indi. İçerisinde trombosit içermediği düşünülen ve TMSB4 değerlerinin sıfır olması beklenirken bu sonuçların elde edilmesi; otolog trombin yapım aşamasında kalsiyum glukonat eklenmesi ile tam kandaki az



sayıdaki trombositlerin pıhtılaşmaya yol açması neticesinde ortama TMSB4 salınımdan kaynaklandığı değerlendirildi. Aynı şekilde gerek TZP-10<sup>3</sup> ve TZP-10<sup>4</sup> gruplarında bu değerler saatlere göre değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre 7-10 kat yüksek ölçüldü. Bu yükseklik TZP içerisindeki yoğun trombosit konsantrasyonuna bağlandı (Tablo 4.7.A.).

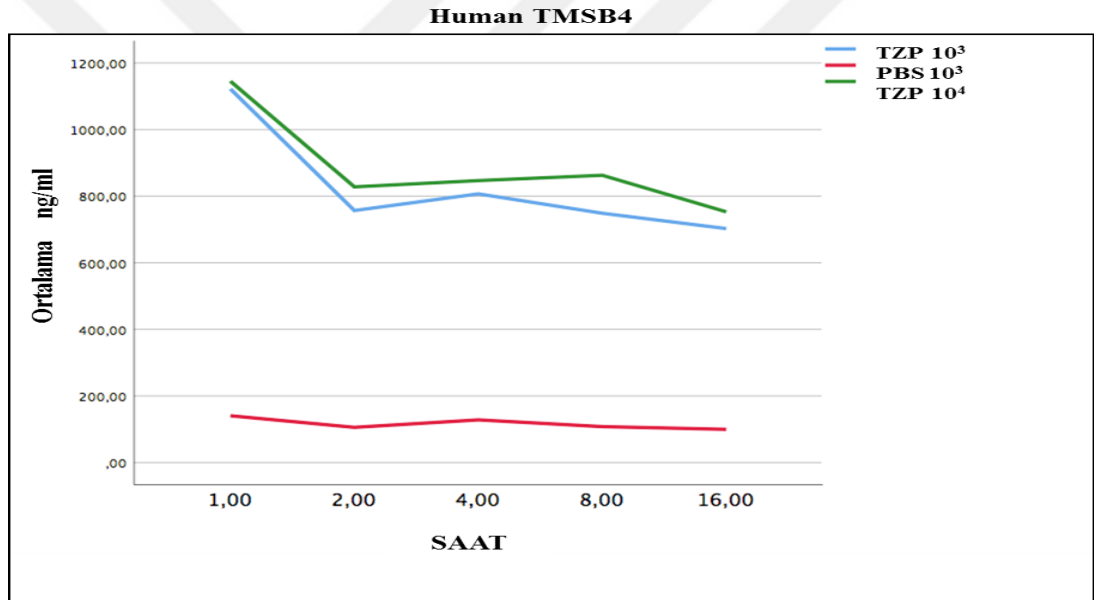
TZP-10<sup>3</sup> ve TZP-10<sup>4</sup> gruplarındaki TMSB4 değerleri incelendiğinde sonuçların birbirine yakın olduğu ve aynı miktarda trombosit içeren her iki çalışma grubunun arasında minimal bir farklılık olmasına rağmen bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.7.A., Tablo 4.7.B.).

Çalışmada planlanan 1., 2., 4., 8., ve 16. saatlerdeki maya koloni sayılarındaki artışa göre TZP-10<sup>3</sup> ve TZP-10<sup>4</sup> gruplarındaki TMSB4 değerleri incelendiğinde ise trombositlerin aktivasyon ile ortama yüksek miktarda TMSB4 saldığı, bu defensinin mayalar ile etkileşime girerek onların üremesini baskıladığı, tedricen miktarında azalma olduğu görüldü (Tablo 4.7.A., Tablo 4.7.B.).

**Tablo 4.7.A.** TZP ve Kontrol Grupları Human TMSB4 Sonuçları.

		<b>TZP 10<sup>4</sup></b>	<b>TZP 10<sup>3</sup></b>	<b>PBS 10<sup>3</sup></b>	<b>TZP 10<sup>3</sup> - TZP 10<sup>4</sup> Karşılaştırma</b>
		<b>Ort±SS</b>	<b>Ort±SS</b>	<b>Ort±SS</b>	<b>p</b>
<b>TMSB4</b>	<b>1.saat</b>	1145,2±225,7	1122±245,2	140,5±22,2	0,68
	<b>2.saat</b>	827,9±114,4	756,8±107,6	105,7±16,7	0,11
	<b>4.saat</b>	846,7±72,8	806,8±191,6	128,2±20,8	0,77
	<b>8.saat</b>	862,7±134,7	748,6±100,5	107,8±21,2	0,11
	<b>16.saat</b>	752,9±364,7	702,6±408,5	99,7±28,8	0,95

**Tablo 4.7.B.** TZP ve Kontrol Grupları Human TMSB4 Sonuçlarının Grafiği.



#### 4.7.2. Trombosit Faktör-4 (PF-4)

Her üç çalışma grubuna (TZP-10<sup>3</sup>, TZP-10<sup>4</sup>, PBS-kontrol) ait PF-4 değerleri araştırıldığında aynı saatlerde birbirine yakın sonuçlar elde edildi ve tüm saatler incelendiğinde her üç grupta da ikinci saat verileri haricinde genel olarak PF-4 miktarında azalma gözlemlendi (Tablo 4.8.A., Tablo 4.8.B.).

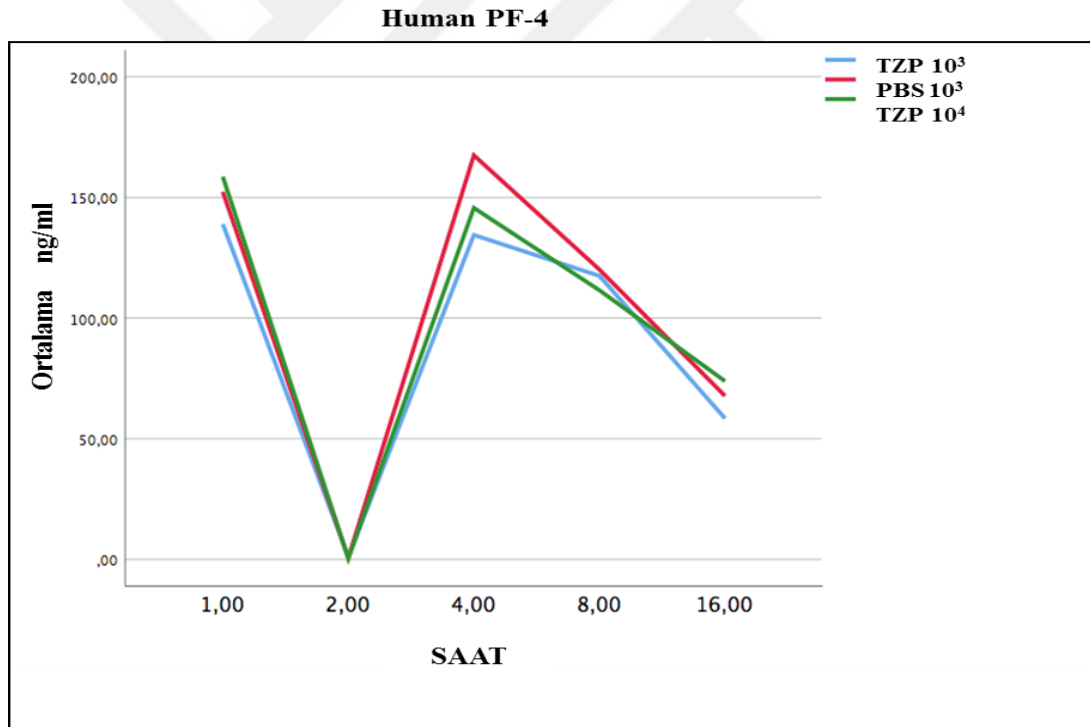
Her üç grup saat saat incelendiğinde PBS-kontrol grubundaki bazı PF-4 değerlerinin gerek TZP-10<sup>3</sup> gerekse TZP-10<sup>4</sup> gruplarından daha yüksek olduğu görüldü. Bu yüksek verilerin elde edildiği saatler maya koloni sayıları ile karşılaştırıldığında PBS-kontrol grubundaki koloni üremeleri her iki TZP grubunda

üreyen koloni sayılarına göre daha yüksek olduğundan PF-4 'ün antifungal etkinlikte rol almadığı düşünüldü (Tablo 4.8.A., Tablo 4.8.B., Tablo 4.3.).

**Tablo 4.8.A.** TZP ve Kontrol Grupları Human PF-4 Sonuçları.

		TZP 10 <sup>4</sup>	TZP 10 <sup>3</sup>	PBS 10 <sup>3</sup>	TZP 10 <sup>3</sup> - TZP 10 <sup>4</sup> Karşılaştırma
		Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	p
<b>PF4</b>	<b>1.saat</b>	158,6±17	138,9±30	152,3±28,9	0,05*
	<b>2.saat</b>	0,4±0,5	0,9±2,3	0,6±0,9	0,92
	<b>4.saat</b>	145,6±27,9	134,4±43,3	169,4±33,9	0,31
	<b>8.saat</b>	111,5±12,4	117,4±9,6	120±17,2	0,09
	<b>16.saat</b>	73,8±19,6	58,4±20,3	67,7±12,4	0,14

**Tablo 4.8.B.** TZP ve Kontrol Grupları Human PF-4 Sonuçlarının Grafığı.



#### 4.7.3. İnterlökin-8 (IL-8)

PBS-kontrol grubunda IL-8'in 1., 2., 4., 8. ve 16. saatlerdeki ELISA sonuçları incelendiğinde en yüksek 20,2±2,4 olarak ölçüldü. PBS-kontrol grubu TZP içermediğinden IL-8 değerlerinin sıfır olması beklenirken bu sonuçların elde

edilmesinin; otolog trombin yapım aşamasında tam kandaki az sayıdaki trombositlerin pıhtılaşmaya yol açması neticesinde ortama IL-8 salınımdan kaynaklandığı değerlendirildi. Bu gruptaki saatlere göre IL-8 değerleri arasında minimal değişiklik saptandığından Tablo 4.9.B.'de düz bir hat olarak gösterildi. Fakat gerek TZP-10<sup>3</sup> gerekse TZP-10<sup>4</sup> gruplarında en yüksek değerler sırasıyla 24683,2±15962,9 ve 28592,4±16757,4 olarak ölçüldü. Bu yükseklik TZP'li gruplardaki yoğun trombosit konsantrasyonuna bağlandı (Tablo 4.9.A.).

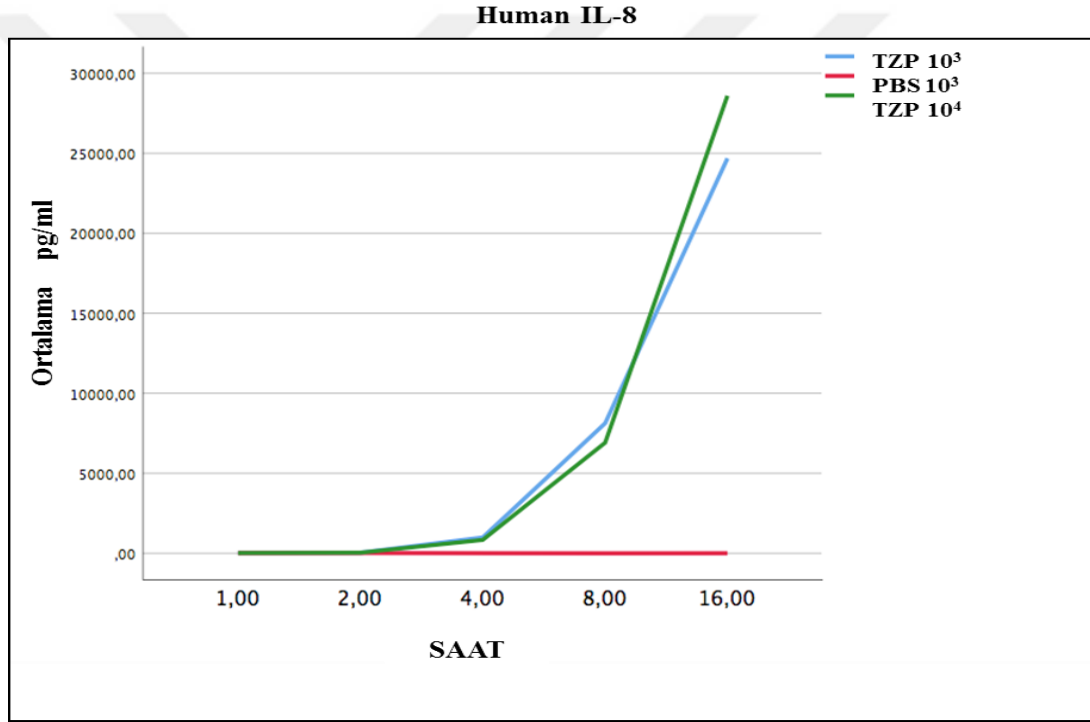
TZP-10<sup>3</sup> ve TZP-10<sup>4</sup> gruplarındaki IL-8 değerleri incelendiğinde sonuçların birbirine yakın olduğu ve aynı miktarda trombosit içeren her iki çalışma grubunun arasında minimal bir farklılık olmasına rağmen bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (p>0,05) (Tablo 4.9.A., Tablo 4.9.B.).

Her iki TZP grubunda IL-8 değerlerindeki artış dikkat çekiciydi. Bu IL-8 seviyesindeki artış farklı saatlerdeki maya koloni sayılarındaki artışa göre incelendiğinde; trombositlerin aktivasyon ile degranüle olup ortama IL-8 salmaya sürekli devam ettiği, IL-8'in mayalar ile etkileşime girmediği ve *Candida albicans* üremesini baskılamada etkisinin olmadığı düşünüldü (Tablo 4.9.A., Tablo 4.9.B., Tablo 4.3.).

**Tablo 4.9.A.** TZP ve Kontrol Grupları Human IL-8 Sonuçları.

		TZP 10 <sup>4</sup>	TZP 10 <sup>3</sup>	PBS 10 <sup>3</sup>	TZP 10 <sup>3</sup> - TZP 10 <sup>4</sup> Karşılaştırma
		Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	p
<b>IL-8</b>	<b>1.saat</b>	17,3±4	20,4±5,5	14,8±2	0,26
	<b>2.saat</b>	37,4±11,6	36,6±12,7	20,2±2,4	0,37
	<b>4.saat</b>	837,3±544,6	991,7±533,6	6,4±0,2	0,31
	<b>8.saat</b>	6611,8±4380	8126,6±6033,5	0,3±0,5	0,01*
	<b>16.saat</b>	28592,4±16757,4	24683,2±15962,9	5±10,9	0,52

**Tablo 4.9.B.** TZP ve Kontrol Grupları Human IL-8 Sonuçlarının Grafiği.



## 5. TARTIŞMA

*Candida* türleri insan vücudunun, barsak lümeni, deri, ağız ve vajen mukozasında normal flora üyesi olarak bulunurlar (157,158). Mantar enfeksiyonları 1980’li yıllardan sonra artış göstermiş olup bu artışın en önemli sebepleri arasında YBÜ’lerde takipli olan hastaların, kanser hastalarının, solid organ nakilli hastaların gelişen tıp teknolojisi sayesinde yaşam sürelerindeki artış sayılmaktadır (23,24). *Candida* türleri en sık izole edilen insan mantar patojenleri arasında yer almaktadır ve yüzeysel mukozal enfeksiyondan ciddi derin sistemik enfeksiyona kadar geniş hastalık spektrumuna sahiptir (157,158,73).

*Candida* türleri içinde hastalardan halen en sık izole edilen tür *Candida albicans*’tır. Temelde konakçının doğasına zarar vererek çeşitli enfeksiyonlara sebep olurlar. Bundan dolayı, *C. albicans* enfeksiyonları sağlıklı bireylerde çok sık görülmez (159). Sağlam deri ve mukozaların enfeksiyon gelişimini engellemede rolü büyüktür. Cilt bütünlüğünün bozulduğu her durumda sağlıklı bireylerde de duyarlı bölgelere *Candida* invazyonu olabilir. Penetrasyon derecesine göre yüzeysel enfeksiyondan invaziv enfeksiyona kadar değişen klinik tablolarla karşılaşılmaktadır (160).

*Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde temel antifungal ilaçlar kullanılmaktadır. Antifungal ilaçlar; azol türevi bileşikler, ekinokandinler ve poliyenlerden oluşmaktadır (161,162). Ancak antifungal ilaçların dar etki spektrumu, ciddi yan etki problemi, dokulara kötü penetrasyon gibi birçok olumsuz özellikleri vardır. Umut vaat eden yeni ilaçlar geliştirilmekte ve bunların bir kısmı klinik olarak denenmektedir. Ancak mantar hücrelerinin insan hücreleri gibi ökaryot yapıda olmalarının yanısıra genetik ve moleküler benzerlikler hatta proteinler arasındaki benzerlikler uygun bir antifungal hedef bulunmasını zorlaştırmaktadır (83). Bu nedenledir ki alternatif tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Trombositten zengin plazmanın (TZP) gün geçtikçe kullanım alanı yaygınlaşmaktadır. Antibakteriyel etkinliği birçok çalışma ile gösterilmiş bu tamamlayıcı destek tedavisinin antifungal tedaviye de alternatif olarak ilave bir

tedavi yöntemi olarak kullanılabilceği yapılan farklı çalışmalarla değerlendirilmektedir (86,147,154-156).

Çeşitli çalışmalarda TZP etkinliğindeki temel farklılığın en önemli nedeni olarak elde edilen TZP'nin içeriğindeki trombosit sayısının değişkenliği buna bağlı olarak ortaya çıkan kemokin, kinosidin ve anti-inflamatuvar sitokin miktarlarındaki değişiklikler olduğu gösterilmiştir (163). Amable ve ark. yapmış oldukları çalışmalarında santrifüj aşamasında yerçekimi gücü (g), süresi ve santrifüj ısısının TZP muhteviyatını oluşturan trombosit sayılarını etkilediğini göstermişlerdir (163). Aynı çalışmada tam kan testi sonuçlarından elde edilen trombosit sayısının en fazla kaç kat arttırılabileceği zerinene çalışmadaki birçok değerin farklı kombinasyonları (g, santrifüj süresi, santrifüj ısısı ve çift devirli santrifüj vb.) kullanılarak en verimli TZP değerleri bulunmaya çalışılmıştır. Birbirinden farklı 17 metod kullanılmasına rağmen TZP'deki trombosit sayılarını en düşük 0,6 kat, en yüksek 5,2 kat arttırabilmişlerdir. Çalışmamızda MagellanPRP™ tam otomatize sistemi kullanılarak bağışçıların TZP'deki trombosit sayısı medyan değer 2165x10<sup>3</sup>/l olarak bulunurken periferik kanlarındaki trombosit sayısı medyan değer ise 244x10<sup>3</sup>/l olarak tespit edildi. Bu sonuçlara göre yaklaşık olarak minimum 7, maksimum 15 kat artış sağlandığı gözlendi.

Mantarlar ile trombosit etkileşimleri üzerine farklı araştırmacılar tarafından çeşitli mantar türleri üzerine yapılmış çalışmalarda trombositlerin değişik mekanizmaları kullanarak etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. Robert ve ark., Perkhofe ve ark., Skerl ve ark., Klotz ve ark., Yeaman ve ark. ve Willcox ve ark. kendi çalışmalarında trombositlerin *Candida* türlerine, *Aspergillus* türlerine ve zigomikoz etkenlerine (*Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp., *Mucor* spp. ve *Absidia* spp.) karşı farklı mekanizmaları kullanarak antifungal etkinlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Yaptığımız literatür taramalarında TZP'nin in vitro olarak *C. albicans* zerine antifungal etkinliğini ile bu etkinlikten sorumlu olabileceği değerlendirilen kemokin, kinosidinlerin zamana göre değişimlerini birarada değerlendiren bir çalışmaya ulaşılamadı.

Çalışmamızda iki farklı maya konsantrasyonu (10<sup>3</sup> ve 10<sup>4</sup> kob/ml) içeren TZP'nin *C. albicans* remesi üzerine 1., 2., 4., 8. ve 16. saat üremeleri koloni sayımları ile incelendi (Tablo 4.3.). Her iki TZP grubunun *C. albicans* zerine in

vitro fungistatik bir etkisinin olduğu gösterildi. Bu etkinin  $10^3$  maya konsantrasyonu içeren TZP grubu ile PBS-kontrol grubu kıyaslandığında 8. saatte halen sürdüğü, 16. saatte ise trombositlerin antifungal etkinliğini kaybettiği görüldü (Tablo 4.5.).

Maya konsantrasyonu arttırıldığında ( $10^4$  kob/ml) TZP'nin antifungal etkinliğinin  $10^3$  kob/ml PBS-kontrol grubu ile kıyaslandığında 4. saatte devam ettiği, 8. saatte ise bu antifungal etkinliğin çok azaldığı, 16. saatte ise bu etkinliğin ortadan kalktığı görülmüştür (Tablo 4.5.).

$10^3$  kob/ml ve  $10^4$  kob/ml maya konsantrasyonu içeren TZP grupları üreme ortalamaları açısından değerlendirildiğinde ise 1., 2., 4. ve 8. saatteki üreme sayıları TZP- $10^3$  grubunda daha azdı. Bu üreme ortalamalarındaki düşüklük maya konsantrasyonuna bağlandı. Her iki grupta eşit miktarda TZP kullanılmış olmasına rağmen bu farka TZP'den salınan kemokin, kinosidin ve trombosit mikrobisidal proteinlerin (PMP) daha yoğun miktardaki *C. albicans* üzerine etkinliğinin erken sonlanmasının neden olabileceği düşünüldü. 16. saatte ise hangi konsantrasyonda olursa olsun üreme ortalamalarının aynı olduğu görüldü.

Willcox ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada farklı *Candida* türlerinin trombositleri kümeliendirebilme yetenekleri ve TZP'nin *Candida* türlerini öldürebilme becerilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada trombositleri belirli oranlarda *Candida* hücreleri ile karıştırmışlar ve  $37^\circ\text{C}$ 'de 4 saatlik inkübasyon sonunda yapılan ekimlerde koloni sayımı yapmışlardır. Ekimler sırasıyla 0. dk, 30. dk, 1. saat ve 4. saatlerde yapılmıştır. Sonuçta *C. albicans* hariç diğer türlerin trombositlerin kümelenmesini sağlayabildiğini, *C. tropicalis* ve *C. stellatoidea*'nın TZP'li ortamda belirli oranlarda öldüğünü buna karşın *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. kefyr*'in üremelerinin baskılandığını ve *C. albicans* suşlarının ise canlılığını koruduğunu saptamışlardır (164). Ancak Yeaman ve ark. yaptıkları çeşitli çalışmalarda *Candida* türlerinin trombositleri uyararak PMP salınımını tetikleyebildiklerini ve bu PMP'lerinde *Candida* türlerine karşı etkili olduklarını göstermişlerdir (154-156). Robert ve ark., çalışmalarında farklı *Candida* türlerinin in vivo olarak trombositleri bağlayabilme yeteneklerini bir fare modelinde araştırmışlardır. Belirli bir sayıda hazırlanan blastokonidyalardan farelere enjekte edildikten sonra 1., 3. ve 15. dakikalarda kan alımını müteakip dolaşımdan temizlenmesini ölçmüşlerdir. Sonuçta *C. albicans*'ın *C. glabrata*'ya kıyasla dolaşımdan 8 kat daha hızlı temizlendiğini



göstermişlerdir. Bu durumu da taramalı elektron mikroskopta trombositlerin *Candida* hücreleriyle karşılaşınca yaşadıkları morfolojik değişimleri ortaya koyarak trombosit aktivasyonu lehine yorumlayarak açıklamışlardır. Bütün bu çalışmalar göstermektedir ki *Candida* türleri trombositlerle etkileşim içindedir ve farklı mekanizmalar vasıtasıyla onları aktive ederek değişen derecelerde antifungal etkinlik ortaya çıkarmaktadır. Bizim çalışmamızda da TZP-10<sup>3</sup>'lü grupta bu antifungal etkinliğin 8. saatte dahil devam ettiği gösterilmiştir. 16. saatte ise bu etkinlik sonlanmıştır. Literatür araştırmalarımızda mantarlar ile ilgili yapılan çalışmalarda bizim yaptığımız şekilde uzun zaman dilimine yayılmış çoklu ekimlerin kullanıldığı bir protokole rastlanmadı. Bu tarz çalışmaların genellikle TZP ile bakteri etkinlik çalışmaları olduğu görüldü.

Mariani ve ark. trombositlerin doku iyileşmesindeki rolüne ilave olarak *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* ve *Streptococcus faecalis* gibi hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenleri üzerine trombositlerin etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında saf trombositten zengin plazma kullanmışlardır. Bu TZP'yi %10'luk Kalsiyum Klorid ile aktive ettikten sonra bu beş mikroorganizmayı farklı bakteri konsantrasyonlarında (10<sup>4</sup> kob/ml, 10<sup>5</sup> kob/ml, 10<sup>6</sup> kob/ml) plaklara ekmişlerdir. 18-24 saatlik inkübasyon sonrası; 1., 2., 4. ve 18. saatlerde koloni sayımlarına geçilmiştir. Tüm gruplarda TZP'nin kontrol gruplarına göre ilk saatlerde önemli derecede bakteri üremesini baskıladığını, bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu, fakat bu etkinin zamanla azaldığını göstermişlerdir. Bakteri konsantrasyonunun arttığı 10<sup>5</sup> kob/ml'lik gruplarda antibakteriyel etkinlik süresinin kısaldığını gözlemlemişlerdir. Bakteri çalışmalarında olduğu gibi bizim çalışmamızda da değişen maya konsantrasyonları (10<sup>3</sup> kob/ml ve 10<sup>4</sup> kob/ml) ile muamele edilen TZP'nin antifungal özelliğinin olduğu gösterildi. Yine Mariani ve ark. bulduğu gibi daha yoğun konsantrasyonlarda mikrobisidal etkinliğin azaldığı saptandı. Mariani ve ark. yaptığı çalışmada etki süresi ilk saatlerde olmakla birlikte bizim çalışmamızda bu süre daha uzundu. Bunun nedeninin bizim çalışma gruplarındaki TZP'nin içeriğinde lökosit bulunması olarak değerlendirildi. Oysa Mariani ve ark.'nın çalışmalarında saf trombosit kullanmışlardı. Ancak bakteri ve mantar gibi farklı mikroorganizmalar üzerine etkinliklerin çalışılması nedeniyle tam bir kıyaslama yapmamızın doğru olmayacağını

değerlendirdik. Ayrıca bizim çalışmamızda kullanılan trombosit sayılarının ( $2165 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) Mariani ve ark. çalışmasında kullandığından ( $290 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) çok daha yüksek oluşunun da bu etki süresinin uzamasında bir diğer etken olabileceği düşünüldü (165).

Anitua ve ark. TZP içerisindeki lökosit miktarında ilave artışın antimikrobiyal etkinliği arttırmadığını göstermişlerdir (166). Fakat TZP'nin antimikrobiyal etkinliği üzerine yapılan başka çalışmalarda ise lökositlerden ziyade trombositlerin antimikrobiyal etkinlikten sorumlu olduğu, trombositlerin başlattığı bu etkiyi lökositlerin arttırmış olabileceği Yang ve ark. ile Drago ve ark. tarafından iddia edilmektedir. Yang ve ark. yaptığı çalışmada TZP içerisinde azda olsa lökositlerin yer almasının, TZP'nin uzamış antimikrobiyal etkisinin lökositler tarafından gerçekleştirilmiş olabileceğini düşündürmüştür. Drago ve ark. yaptığı çalışmada TZP'deki lökosit miktarındaki artışın doğrudan antimikrobiyal potansiyeli güçlendirdiği savunulmuştur (167,168). Bizim çalışmamızda da TZP grubunun PBS-kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucu antifungal etkinliğinin ana sebebinin trombositlerin varlığı olduğu düşünülürken aynı zamanda kullanılan TZP'nin lökositli oluşunun da bu etkinlikte rol oynayabilecek ikinci bir neden olabileceği düşünüldü.

Mayaların üremelerinin kontrol edildiği inkübasyon süresi oldukça önemli olan bir diğer konudur. Bu kontrolün sık sık (saat başı gibi) yapılması her ne kadar ideali olsa da örneklem sayısından dolayı yapılabilir değildir. Çünkü bir ekim biterken doğrudan diğer ekime geçilmesi gerektiğinden ekim saatlerine yetişilemeyecektir. Çalışmamızda maya üremelerinin kontrol edildiği süreler 1., 2., 4., 8. ve 16. saatler olarak belirlenmiştir. 16. saatte TZP grubundaki maya üremeleri kontrol grubuyla (PBS) eşdeğer hale gelmiştir. Her ne kadar saat başı ekim yapılamamış olsa da çalışmada kullanılan ekim saatleriyle TZP grubunun antifungal etkinliğinin saptanması açısından yeterli olduğu sonucuna varıldı. Fakat çalışma protokolümüz sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde TZP- $10^3$  grubunda 8. saatte dahil olmak üzere antifungal etkinin olduğu ve 16. saatte bu etkinin sonlandığı tespit edilirken *C. albicans* için bu etkinin sonlanım noktasının net belirlenmesi amacıyla 10., 12. ve 14. saatlerde ilave ekimler yapılmasının daha uygun olabileceği düşünüldü.

Çalışmamızda trombositlerin aktivasyonu için kullandığımız kalsiyum glukonat uygulamasının ilk saatlerinde trombositlerden salgılanan mikrobisidal moleküllerin yoğunluğunu arttırdığı bilinmektedir. Buna ilaveten Moojen ve ark. yaptığı çalışmada TZP'ye trombin eklenmesinin lökositleri etkilemediği, bu yüzden 1-4. saatlerdeki antimikrobiyal aktivitenin çoğunlukla trombosit kaynaklı olduğu göstermişlerdir (169). Bununla birlikte aktive trombositlerden salınan belirli bazı kemokinler ve kinosidinler mevcuttur. Bunların çoğu  $\alpha$  granüllerde yer almaktadır. Bunlar içinde en iyi bilinen ve ilk tanımlananları Trombosit Faktör-4 (PF-4) ve  $\beta$ -Tromboglobulin ( $\beta$ -TG)'dir. Bunlardan başka öncelikli olarak lökositlerden köken alan ancak trombositlerden de salgılanan IL-8 bir diğer kemokindir. Ayrıca biraz daha sonra tanımlanmış bir kemokin olan RANTES (T Lenfosit Hücrelerinin Ekspresyonu ve Salınımı) ve bir polipeptid olan Timosin- $\beta$ 4 (TMSB4)'ünde çeşitli trombosit fonksiyonları ile ilişkili olduğu bilinmektedir (170-172). IL-8, nötrofillerin doku enflamasyonunun bulunduğu alana toplanmasını sağlayan bir kemoatraktan olarak görev yapar. RANTES'in trombin ile aktive olmuş trombositlerin  $\alpha$  granüllerinden salınarak esasen monositler için kemoatraktan görev yaptığı bununla birlikte eozinofilleri etkileyerek onları degranüle ettiği ve bazofillerden de histamin salınımını tetiklediği gösterilmiştir (171). TMSB4 ise anjiogenez, yara iyileşmesi ve enflamasyonun düzenlenmesinde görev almaktadır (172). Bizim çalışmamızda olduğu gibi literatür taramalarımızda üç farklı parametreyi değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlanılmadığından elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilemedi. Yalnızca Willcox ve ark. çalışmasında IL-8'in *C. albicans* ve diğer *Candida* türlerinden bazıları ile karşılaşmış trombositlerden salındığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da *C. albicans* ile muamele edilen TZP gruplarından IL-8 salınımı tespit edildi. Hatta çalışmanın ilerleyen saatlerinde her iki TZP'li grupta IL-8 seviyelerinde dikkat çekici artışlar gözlemlendi. Bu IL-8 seviyesindeki artış farklı saatlerdeki maya koloni sayılarındaki artışa göre incelendiğinde; trombositlerin aktivasyon ile degranüle olup ortama IL-8 salmaya sürekli devam ettiği, IL-8'in mayalar ile etkileşime girmediği ve *Candida albicans* üremesini baskılamada etkisinin olmadığı düşünüldü. Ancak PBS-kontrol grubu TZP içermediğinden IL-8 değerlerinin sıfır olması beklenirken çok düşük miktarlarda değerler elde edilmesinin; otolog trombin yapım aşamasında tam kandaki az sayıdaki

trombositlerin pıhtılaşmaya yol açması neticesinde ortama IL-8 salınımdan kaynaklandığı değerlendirildi. Aynı durum ile çalışmamızın TMSB4 ELISA analizlerinde PBS-kontrol grubunda da karşılaşıldı. TZP-10<sup>3</sup> ve TZP-10<sup>4</sup> gruplarında TMSB4 analizlerinde PBS-kontrol grubuna göre 7-10 kat yüksek değerler ölçüldü. Bu yükseklik TZP grupları içerisindeki yoğun trombosit konsantrasyonuna bağlandı. Çalışmada planlanan 1., 2., 4., 8., ve 16. saatlerdeki maya koloni sayılarındaki artışa göre TZP-10<sup>3</sup> ve TZP-10<sup>4</sup> gruplarındaki TMSB4 değerleri incelendiğinde ise trombositlerin aktivasyon ile ortama yüksek miktarda TMSB4 saldığı bu defensinin mayalar ile etkileşime girerek onların üremesini baskıladığı, tedricen miktarında azalma olduğu görüldü. Halbuki IL-8 seviyelerinde ilerleyen saatlerde de artış söz konusuydu. Bu sonuçlara göre aktive edilen TZP'nin *C. albicans* üremesini baskılamada TMSB4 üzerinden etkili olduğu, IL-8'in ise herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varıldı.

PF-4'ün aktive trombositlerden salgılanıp trombosit kümelenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (170-172). Çalışmamızın PBS-kontrol grubundaki bazı PF-4 değerlerinin gerek TZP-10<sup>3</sup> gerekse TZP-10<sup>4</sup> gruplarından daha yüksek olduğu görüldü. Bu yüksek veriler elde edildiği saatlerdeki maya koloni sayıları ile karşılaştırıldığında PBS-kontrol grubundaki koloni üremeleri her iki TZP grubunda üreyen koloni sayılarına göre daha yüksek olduğundan PF-4'ün antifungal etkinlikte rol almadığı düşünüldü. Literatür taramasında çok sınırlı sayıda TZP'nin *C. albicans* üzerine etkinliği ile ilgili yayına ulaşılırken bu çalışmaların hiçbirinde sonuçlarımızı kıyaslayabileceğimiz PF-4'ün antifungal etkinlikteki rolünü gösteren herhangi bir veriye ulaşılamadı.

Son olarak Drago ve ark. TZP ile dört farklı bakteri ve *C. albicans* üzerine minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) belirlemek üzere yaptıkları çalışmada; bakteriler için MBK değerlerini MİK değerlerinin 3-4 katı olarak bulurken, *C. albicans* için bulunan MİK değerlerinin bakterilere kıyasla 2 kat gibi yüksek oluşu nedeniyle mayayı öldüremediklerini ifade etmişlerdir (168). Çalışmamızda literatürdeki en yüksek trombosit değerlerine ulaşmayı sağlayan sistemlerden biri olan tam otomatize kapalı MagellanPRP™ cihazı kullanıldı. En düşük konsantrasyonda en yüksek trombosit değerleri elde edilen grubumuzda dahi Drago ve ark. çalışmasındaki gibi *C. albicans* üremelerini

tamamen yok edemedik. Koloni üremeleri üzerine baskı sınırlı bir süreyle geçerliydi. Hastalarda kullanılan ilaçlar gibi tekrarlayan dozlarda TZP uygulamaları ile bu etki daha uzun sürelere erişebilir hatta üremeleri tamamen baskılayacak değerler elde edilebilir. Ayrıca antifungal etkinlikte rol oynayabileceği düşünülen bütün kemokin, kinosidin ve PMP'leri kapsayan geniş çaplı bir projeye gereksinim duyulmaktadır.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Trombositten Zengin Plazma (TZP) grubunda Beyaz Küre (WBC) sayısı;  $49,4 \times 10^3/\mu\text{l}$ , Trombosit sayısı  $2165 \times 10^3/\mu\text{l}$  olarak saptanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız MagellanPRP™ tam otomatize sisteminin bağışçıların periferik kanlarındaki trombosit sayısını güvenilir bir şekilde (minimum 7, maksimum 15 kat) arttırdığı görülmüştür. TZP eldesinde maksimum etkinlik'ninsı için tam otomatize kapalı sistemlerin kullanılması ile en yüksek trombosit ve lökosit değerleri elde edilebilir. Bu değerler başarıyı etkileyen en önemli etkendir.
2. TZP'nin çeşitli mikroorganizmalar üzerine yapılan çalışmalarda birtakım farklılıkları gözlenmektedir. Bunun en önemli nedeninin elde edilen TZP'deki trombosit sayısından kaynaklandığı, dolayısı ile sayıya ve aktivasyona bağlı olarak ortaya çıkan kemokin, kinosidin ve platelet mikrobisidal protein miktarlarındaki değişikliklerden bu farklılığın ortaya çıktığı düşünülmüştür.
3. TZP'nin *C. albicans* izolatı üzerine  $10^3$  kob/ml maya konsantrasyonunda antifungal etkinliğini göstermek amacıyla yapılan koloni sayım medyan değerleri 1. saat için 3; 2. saat için 7; 4. saat için 34; 8. saat için 143 ve son olarak 16. saat için 500 olarak bulunmuştur. Bu üremeler TZP'nin *C. albicans* üzerinde 8 saat boyunca antifungal etki gösterdiği, zamanla bu etkinin azaldığı, 8-16. saatte etkinin kaybolduğunu göstermektedir.
4. TZP'nin kontrol grubuna göre *C. albicans* üremesi üzerine etkinliği karşılaştırıldığında 1., 2., 4. ve 8. saatte üreyen koloni sayısının TZP'li grupta istatistiksel anlamlı olacak şekilde daha az olduğunu göstermiştir.
5. İki farklı maya konsantrasyonuna sahip ( $10^3$  ve  $10^4$  kob/ml) TZP'li grubun antifungal etkinlikleri kıyaslandığında gerek maya üremesi üzerine baskı gücünün, gerekse gücünü devam ettirme süresinin  $10^3$  maya konsantrasyonuna sahip TZP'de daha yüksek olduğu saptanmıştır.  $10^3$  maya konsantrasyonuna sahip TZP'li grupta etkinlik 8. saatte dahil devam ederken

10<sup>4</sup> maya konsantrasyonu içeren grupta antifungal etkinliğin 4. saatten sonra azalarak kaybolduğu bulunmuştur.

6. TZP'nin koloni üremeleri üzerine baskısı sınırlı bir süreyle geçerliydi. Hastalarda kullanılan ilaçlar gibi tekrarlayan dozlarda TZP uygulamaları ile bu etki daha uzun sürelerle erişebilir hatta üremeleri tamamen baskılayacak değerlerin elde edilebileceği öngörüldü.
7. Çalışmamızda *C. albicans* ile muamele edilen TZP gruplarından IL-8 salınımı tespit edildi. Hatta çalışmanın ilerleyen saatlerinde her iki TZP'li grupta IL-8 seviyelerinde dikkat çekici artışlar gözlemlendi. Bu IL-8 seviyesindeki artış farklı saatlerdeki maya koloni sayılarındaki artışa göre incelendiğinde; trombositlerin aktivasyon ile degranüle olup ortama sürekli IL-8 salmaya devam ettiği, IL-8'in mayalar ile etkileşime girmediği ve *Candida albicans* üremesini baskılamada etkisinin olmadığı düşünüldü. TMSB4 analizlerinde TZP gruplarında PBS-kontrol grubuna göre 7-10 kat yüksek değerler ölçüldü. Bu yükseklik TZP grupları içerisindeki yoğun trombosit konsantrasyonuna bağlandı. Çalışmada planlanan 1., 2., 4., 8., ve 16. saatlerdeki maya koloni sayılarındaki artışa göre TZP-10<sup>3</sup> ve TZP-10<sup>4</sup> gruplarındaki TMSB4 değerleri incelendiğinde ise trombositlerin aktivasyon ile ortama yüksek miktarda TMSB4 saldığı bu defensinin mayalar ile etkileşime girerek onların üremesini baskıladığı, tedricen miktarında azalma olduğu görüldü. PF-4'ün PBS-kontrol grubundaki değerlerinin gerek TZP-10<sup>3</sup> gerekse TZP-10<sup>4</sup> gruplarından daha yüksek olduğu görüldü. Bu yüksek veriler elde edildiği saatlerdeki maya koloni sayıları ile karşılaştırıldığında PBS-kontrol grubundaki koloni üremeleri her iki TZP grubunda üreyen koloni sayılarına göre daha yüksek olduğundan PF-4'ün antifungal etkinlikte rol almadığı düşünüldü.

Sonuç olarak TZP'nin *Candida albicans* koloni üremeleri üzerine baskısı sınırlı bir süreyle geçerliydi. Hastalarda kullanılan ilaçlar gibi tekrarlayan dozlarda TZP uygulamaları ile bu etki daha uzun sürelerle erişebilir hatta üremeleri tamamen baskılayacak değerler elde edilebilir. Ayrıca antifungal etkinlikte rol oynayabileceği düşünülen bütün kemokin, kinosidin ve PMP'leri kapsayan geniş çaplı bir projeye gereksinim duyulmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9(4): 499-511.
2. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(1): 133-63.
3. Cheng MF, Yu KW, Tang RB, et al. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia from 1996 to 1999. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48(1): 33-7.
4. Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012; 73 (1): 45-8.
5. Lewis RE. Overview of the changing epidemiology of candidemia. *Curr Med Res Opin*, 2009; 25 (7): 1732-40.
6. Eggimann P, Pittet D. *Candida* colonization index in the management of critically ill patients, pp: 604-12. In: Vincent J-L (ed), *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine*. 2006, Springer Link, Springer Berlin Heidelberg, Germany.
7. Hazen KC, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus* ve Tıbbi Önemi Olan Diğer Mayalar, 9ncu baskı, Ankara: Atlas Kitapçılık, 2009.
8. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. *Clinical Mycology*. 2nd, Churchill Livingstone: Elsevier Inc, 2009.
9. Espinel-Ingroff A, White T, Pfaller MA. Antifungal agents and susceptibility test methods, pp: 1859-80. In: Murray PR, Baron EJ, Tenover FC, Tenover RH (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2003, 8<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington, DC.
10. Yücel A. *Candida*'ların dünü. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y. *Candida Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu*, Tutanaklar. Eskişehir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını. 2002; 43: 3-28.
11. Koç AN. Tıbbi Bakımdan Önemi Olan *Candida* Türlerinin Mikolojik Özellikleri. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y. *Candida Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu*, Tutanaklar. Eskişehir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını. 2002; 43: 37-45.
12. Barnett JA. A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. *Yeasts* 2008; 25: 385-417.
13. Edwards JE. *Candida* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2005; p. 2938-58.
14. Brandt ME, Warnock DW. Taxonomy and Classification of Fungi. In: Versalovic J. *Manual of Clinical Microbiology*. Vol 2, 10th edn. Washington D.C: ASM Press. 2011; 1747-1755.



15. Howell SA, Hazen KC. *Candida*, *Cryptococcus* and Other Yeasts of Medical Importance. In: Versalovic J. Manual of Clinical Microbiology. Vol 2, 10th edn. Washington D.C: ASM Press. 2011; 1793-1821.
16. de Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi. 2nd edn, Netherlands, Utrecht. CBS, 2000; 178-300.
17. Calderone RA. Taxonomy and biology of *Candida*. In: Calderone RA, ed. *Candida* and *Candidiasis*. 1st ed. Washington DC, Am Soc Microbiol Press 2002; 15-27.
18. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Lippincott Philadelphia New York 1997; 983-1069.
19. John E, Edwards JR. *Candida* species. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth edition. Pennsylvania, Churchill Livingstone 2000; 2656-2674.
20. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *Candida albicans*'ın Taksonomisindeki Önemli Bazı Değişiklikler. Cerrahpaşa J Med 1999; 30(3): 236-246.
21. Çerikçioğlu N. *Candida* türleri. İçinde: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (ed). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi-Etkenlere Göre Enfeksiyonlar. Cilt 2, 3. Basım, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2008; 2411-26.
22. Kiraz N. İnsanda Hastalık Yapan Mantarlar. İçinde: Kiraz N (ed). Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ders Kitabı, 2. Cilt, İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi, 2011; 1367-1373.
23. Ener B. Fungal İnfeksiyonların Epidemiyolojisi. İçinde: Fungal İnfeksiyonlar ve Tedavisi. Arman D, Odabaşı Z (ed). Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi. 2009; 9-17.
24. Segal E, Elad D. *Candidiasis*. In: Merz W, Hay R. Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections. Medical Mycology. 10th edn. London: Hodder Arnold. 2005; 579-623.
25. Ener B. *Candida* Enfeksiyonlarında Epidemiyoloji Ve Laboratuvar Tam. ANKEM Derg 2008; 22(Ek 2): 264-269.
26. İris NE, Arat ME, Şimşek F ve ark. Yoğun Bakım Ünitelerinde Yatan Hastalardan İzole Edilen *Candida* Türlerinin Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıkları. Klimik Dergisi 2008; 21(2): 61-64.
27. Iwen PC. Mycotic Diseases. In: McPherson: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, vol. 61 Chapter. An Imprint of Elsevier. W.B. Saunders, 2011: 1164-1168.
28. Mishra NN, Prasad T, Sharma N ve ark. Pathogenicity and Drug Resistance in *Candida Albicans* and Other Yeast Species. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 2007; 54 (3): 201-23.
29. Smith JA, Kauffman CA. Recognition and prevention of nosocomial invasive fungal infections in the intensive care unit. Critical care medicine 2010; 38(8 Suppl): 380-387.
30. Yeğenoğlu Y. *Candida* İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y. *Candida* Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu, Tutanaklar. Eskişehir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını 2002; 43: 55-63.
31. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to

- fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. J Clin Microbiol 2010; 48(4): 1366-77.
32. Tümbay E. Kandida türleri. Ustaçalebi Ş, ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Öncü basımevi. Güneş Kitabevi 1999; 1081-1085.
  33. Edwards JE. *Candida* Species. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, eds. Principles and Practice of Infectious Disease. Vol 2. New York, Churchill Livigstone 1995; 2289-2306.
  34. Kuştimur S. Kandida patogenezinde rol oynayan faktörler. Mikrobiyol Bult 1994; 28: 175-181.
  35. Erbakan N. Derinin mantar hastalıkları. Ankara, Türkiye Klinikleri Yayınevi 1989; 1-332.
  36. Kirkpatrick CH. Host factors in defence against fungal infections. Am J Med, 1984; 30: 1-12.
  37. Aynalı A. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde izole edilerek tiplendirilen *Candida*'larda virulans faktörlerinin araştırılması ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi (Tıpta Uzmanlık Tezi). Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi; 2010.
  38. Arslan U, Fındık D. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* türü maya mantarlarında virulans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in-vitro araştırılması. İnfek Derg 2003; 17(4): 471-481.
  39. Critchley IA, Kouglass JL. Isolation and partial characterization of an adhesin from *Candida albicans*. J Gen Microbiol 1978; 133: 629-632.
  40. Öztaş M. *Pityriasis versicolor* ve *Candida* infeksiyonları. 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Ankara, Kongre Kitabı 2001; 85-89.
  41. Kuştimur S. *Candida*'da virulans faktörleri. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (4-6 Mayıs 1999, İzmir) Tutanaklarda. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi 1999; 145-50.
  42. İnci R. *Candida* infeksiyonlarının patogenezinde konağın rolü. Kandida mikrobiyolojisi ve infeksiyonları simpozyumu (21-22 Haziran 2002, Eskişehir) Kitabı. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti 2002; 71-83.
  43. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. Kandidaların patojenlik belirtgenleri. Cerrahpaşa J Med 2000; 31: 172-186.
  44. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. *Candida albicans*'ta mannan: çeşitli özellikleri ve önemi. Cerrahpaşa J Med 2004; 35: 42-45.
  45. Ghannoum MA, Abu Elteen KH: Pathogenicity determinants of *Candida*. Mycoses, 1990;33 (6) : 265-282.
  46. Odds FC. Presidential address. *Candida albicans*, the life and times of a pathogenic yeast. J Med Vet Mycol 1994; 32(1): 1-8.
  47. Olsen I: Oral adhesion of yeasts. Acta Odontol Scand, 1990;48: 45-53.
  48. Odds FC: *Candida* and Candidosis : A Review and Bibliography, 1988, BailliereTindall, U.K .
  49. Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. J Microbiol Immunol Infect 2003; 36: 223-228.
  50. Ray TL, Payne CD. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. Infect Immun 1990; 58: 508-514.

51. Ghannoum M, Elteen KA. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strain of *Candida albicans*. J Med Vet Myco 1986; 24: 407-413.
52. Kiraz N. *Candida* türlerinde fenotipik ve genotipik tiplendirme. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, İzmir, Kongre Kitabı 1999; 125-135.
53. Dutton S, Penn WC: Biological attributes of colony-type variants of *Candida albicans*. J Gen Microbiol, 135: 3363-72, 1989 .
54. Yandımalamadım S. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enfeksiyon etkeni *Candida* türlerinin virulans faktörlerinin (slime üretimi, hemolitik aktivite, proteinaz, fosfolipaz, esteraz, lipaz enzimleri) araştırılması. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul 2004.
55. Özcan SK. Tıbbi gereçlerle ilişkili *Candida* biyofilm ve enfeksiyonları. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007; 27: 589-600.
56. Yakupoğulları Y, Aşçı Toraman Z. Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Candida* kökenlerinde slime faktörü üretiminin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004; 34: 178-181.
57. Alexander JW, Boyce ST. The process of microbial translocation. Ann Surg, 1990; 212: 496-512.
58. Kennedy MJ, Volz PA. Ecology of *Candida albicans* gut colonisation: Inhibition of *Candida* adhesion, colonisation, and dissemination from the gastrointestinal tract by bactericidal antagonism. Infect Immun, 1985; 49: 654-63.
59. Tüzün Y, Serdaroğlu S. Kandidiasis. İçinde: Tüzün Y, Gürer MA, Serdaroğlu S, Oğuz O, Aksungur VL. Dermatoloji 1.Cilt, 3.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. 2008; 360-62.
60. İnan D. Kütanöz-Subkütanöz Fungal İnfeksiyonlar. İçinde: Fungal İnfeksiyonlar ve Tedavisi. Arman D, Odabaşı Z (ed). Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi. 2009; 53-61.
61. Uzun Ö. Nozokomiyal hematojen kandidiyazis. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y (ed). *Candida* Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu, Tutanaklar. Eskişehir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını 2002; 43: 117-124.
62. Azap A. Hematojen Yayılımlı Fungal Enfeksiyonlar. İçinde: Fungal İnfeksiyonlar ve Tedavisi. Arman D, Odabaşı Z (ed). Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi. 2009; 95-104.
63. Wilke A. Kandidemi nasıl değerlendirilmeli? Ne yapılmalı? İnfeksiyon Derg 2007; 2: 117-122.
64. Kartal ED. Fungal Üriner Sistem Enfeksiyonları. İçinde: Fungal İnfeksiyonlar ve Tedavisi. Arman D, Odabaşı Z (ed). Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi. 2009;73-84.
65. Fisher JF, Sobel JD, Kauffman CA, Newman CA. *Candida* Urinary Tract Infections-Treatment, Clinical Infectious Diseases 2011; 52(S6): 57-66.
66. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of *Candidiasis*: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases 2009; 48: 503-35.
67. Edwards JE. *Candida* Species. İn: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett' s Principles and Practice of Infectious Diseases. Vol 2, 7th edn. Churchill Livingstone: Philadelphia. 2010: 3225-3241.

68. Çaylan R, Arslan T. Santral Sinir Sistemi Fungal İnfeksiyonları. İçinde: Fungal İnfeksiyonlar ve Tedavisi. Arman D, Odabaşı Z (ed). Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi. 2009; 85-90.
69. Akduman D. Fungal Solunum Yolu İnfeksiyonları. İçinde: Fungal İnfeksiyonlar ve Tedavisi. Arman D, Odabaşı Z (ed). Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi. 2009; 63-72.
70. Koç N. Klinik Örnek Seçimi, Alınması ve gönderilmesi. I. Ulusal Tıbbi Mikoloji Simpozyumu, Geleneksel ve Yeni Tanı Yöntemleri, Tutanaklar. İzmir, 2013; 3-8.
71. Toraman ZA. Kültür ve İdentifikasyon (Geleneksel). I. Ulusal Tıbbi Mikoloji Simpozyumu, Geleneksel ve Yeni Tanı Yöntemleri, Tutanaklar. İzmir, 2013;16-31.
72. Tümbay E. Candida, Cryptococcus ve Tıbbi Önemi Olan Diğer Mayalar, in Klinik Mikrobiyoloji. Başustaoğlu A (çeviren). 9. Baskı, Ankara: Atlas kitapçılık, 2009; 1762-1788.
73. Ustaçelebi Ş, Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Tünmay E, Mete Ö. Candida türler. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Güneş Kitabevi, 1081-86, 1999.
74. Fothergill AW. Medically significant fungi. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology. 3. Ed., St. Louis: Saunders Elsevier, 2007: 750-756.
75. <https://tr.pinterest.com/pin/145522631686218593/> 03.06.2018.
76. <http://yeastinfectioncause.net/2014/04/10/candida-albicans-colonies-on-agar-sabouraud-4/> 03.06.2018.
77. <http://www.cram.com/flashcards/mycology-practical-698335> 04.06.2018.
78. <https://drfungus.org/knowledge-base/candida-albicans/> 04.06.2018.
79. Murray MP, Zinchuk R, Larone DH. CHROMagar Candida as the Sole Primary Medium for Isolation of Yeasts and as a Source Medium for the Rapid- Assimilation-of-Trehalose Test. Journal of Clinical Microbiology 2005; 43(3):1210-1212.
80. Sivakumar VG, Shankar P, Nalina K ve ark. Use of CHROMagar in the Differentiation of Common Species of Candida. Mycopathologia 2009; 167: 47- 49
81. Kalaiarasan K, Singh R, Chaturvedula L. Fungal Profile of Vulvovaginal Candidiasis in a Tertiary Care Hospital. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2017 Mar, Vol-11(3): DC06-DC09.
82. Saraçlı MA. Mikozyların Moleküler Tanısı: Neredeyiz? 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Konya: Kongre Kitabı 2005; 33-45.
83. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS ve ark, Jawetz, Menick ve Adelberg's Tıbbi Mikrobiyoloji. Yenlen OŞ (Çeviri Ed.) 24 baskı, İstanbul: Nobel, 2010.
84. Başustaoğlu A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M ve ark. "Mantar Hastalıklarının Laboratuvar Tanısı". Tıbbi Mikrobiyoloji (Medical Microbiology, Patrick R. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, 6th. Ed., Philadelphia: Mosby Elsevier, 2010), Bölüm 7:699.
85. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. Blood Rev 2009; 23: 177-189
86. Yeaman MR. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. Nat Rev Microbiol. 2014;12(6):426-37.

87. Boyapati L, Wang HL. The role of platelet-rich plasma in sinus augmentation: a critical review. *Implant Dent* 2006; 15: 160-170
88. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 403-412
89. Yeaman MR. Platelets in defense against bacterial pathogens. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(4):525-44.
90. Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res.* 2002;22(9):913-22.
91. Yeaman MR. The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clin Infect Dis.* 1997;25(5):951-68; quiz 69-70.
92. Yeaman MR, Bayer AS. Antimicrobial peptides from platelets. *Drug Resist Updat.* 1999;2(2):116-26.
93. Elzey BD, Sprague DL, Ratliff TL. The emerging role of platelets in adaptive immunity. *Cell Immunol.* 2005;238(1):1-9.
94. Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(6):445-57.
95. Fodor J. Die fähigkeit des blutes bakterien zu vernichten. *Dtsch Med Wochenschr* 1887;13:745-7.
96. Gengou O. De l'origine de l'axénine de serums normaux. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 1901(15):232-45.
97. Tocantins LM. The mammalian blood platelet in health and disease. *Medicine.* 1938(17):155-257.
98. Hirsch JG. Comparative bactericidal activities of blood serum and plasma serum. *J Exp Med.* 1960;112:15-22.
99. Myrvik QN, Weiser RS. Studies on antibacterial factors in mammalian tissues and fluids. I. A serum bactericidin for *Bacillus subtilis*. *J Immunol.* 1955;74(1):9-16.
100. Jago R, Jacox RF. Cellular source and character of a heatstable bactericidal property associated with rabbit and rat platelets. *J Exp Med.* 1961;113:701-11.
101. Donaldson DM, Tew JG. beta-Lysin of platelet origin. *Bacteriol Rev.* 1977;41(2):501-13.
102. Johansson D, Shannon O, Rasmussen M. Platelet and neutrophil responses to Gram positive pathogens in patients with bacteremic infection. *PLoS One.* 2011;6(11):e26928.
103. Weksler BB, Nachman RL. Rabbit platelet bactericidal protein. *J Exp Med.* 1971;134(5):1114-30.
104. Tew JG, Roberts RR, Donaldson DM. Release of beta-lysin from platelets by thrombin and by a factor produced in heparinized blood. *Infect Immun.* 1974;9(1):179-86.
105. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol.* 2005;83(2):196-8.
106. Shiraki R, Inoue N, Kawasaki S, Takei A, Kadotani M, Ohnishi Y, et al. Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thromb Res.* 2004;113(6):379-85.

107. Yeaman MR. Bacterial-platelet interactions: virulence meets host defense. *Future Microbiol.* 2010;5(3):471-506.
108. Clemetson KJ, Clemetson JM, Proudfoot AE, Power CA, Baggiolini M, Wells TN. Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. *Blood.* 2000;96(13):4046-54.
109. Lopez JA. The platelet Fc receptor: a new role for an old actor. *Blood.* 2013;121(10):1674-5.
110. Trier DA, Gank KD, Kupferwasser D, Yount NY, French WJ, Michelson AD, et al. Platelet antistaphylococcal responses occur through P2X1 and P2Y12 receptor-induced activation and kinocidin release. *Infect Immun.* 2008;76(12):5706-13.
111. Zhang G, Han J, Welch EJ, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya TA, Malik AB, et al. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol.* 2009;182(12):7997-8004.
112. Thammavongsa V, Schneewind O, Missiakas DM. Enzymatic properties of *Staphylococcus aureus* adenosine synthase (AdsA). *BMC Biochem.* 2011;12:56.
113. Yount NY, Cohen SE, Kupferwasser D, Waring AJ, Ruchala P, Sharma S, et al. Context mediates antimicrobial efficacy of kinocidin congener peptide RP-1. *PLoS One.* 2011;6(11):e26727.
114. Yount NY, Waring AJ, Gank KD, Welch WH, Kupferwasser D, Yeaman MR. Structural correlates of antimicrobial efficacy in IL-8 and related human kinocidins. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(3):598-608.
115. Durr M, Peschel A. Chemokines meet defensins: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infect Immun.* 2002;70(12):6515-7.
116. Yount NY, Gank KD, Xiong YQ, Bayer AS, Pender T, Welch WH, et al. Platelet microbicidal protein 1: structural themes of a multifunctional antimicrobial peptide. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(11):4395-404.
117. Yeaman MR, Yount NY, Waring AJ, Gank KD, Kupferwasser D, Wiese R, et al. Modular determinants of antimicrobial activity in platelet factor-4 family kinocidins. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(3):609-19.
118. Azizi N, Li, C., *Staphylococcus aureus* elicits release of platelet microbicidal proteins in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1996;36th Interscience Conference:Abstract no. 866.
119. Bayer AS, Ramos MD, Menzies BE, Yeaman MR, Shen AJ, Cheung AL. Hyperproduction of alpha-toxin by *Staphylococcus aureus* results in paradoxically reduced virulence in experimental endocarditis: a host defense role for platelet microbicidal proteins. *Infect Immun.* 1997;65(11):4652-60.
120. Yount NY, Kupferwasser D, Spisni A, Dutz SM, Ramjan ZH, Sharma S, et al. Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-2 and crotamine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(35):14972-7.

121. Yount NY, Yeaman MR. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(19):7363-8.
122. Joseph M, Auriault C, Capron M, Ameisen JC, Pancre V, Torpier G, et al. IgE-dependent platelet cytotoxicity against helminths. *Adv Exp Med Biol*. 1985;184:23-33.
123. White JG. Platelets are coverocytes, not phagocytes: uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system. *Platelets*. 2005;16(2):121-31.
124. Zander DM, Klingler M. The blood platelets contribution to innate host defense - what they have learned from their big brothers. *Biotechnol J*. 2009;4(6):914-26.
125. Stephen J, Emerson B, Fox KA, Dransfield I. The uncoupling of monocyte-platelet interactions from the induction of proinflammatory signaling in monocytes. *J Immunol*. 2013;191(11):5677-83.
126. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev*. 2007;21(2):99-111.
127. McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe*. 2012;12(3):324-33.
128. Jenne CN, Wong CH, Zemp FJ, McDonald B, Rahman MM, Forsyth PA, et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe*. 2013;13(2):169-80.
129. Miedzobrodzki, J. *et al*. Platelets augment respiratory burst in neutrophils activated by selected species of gram-positive or Gram-negative bacteria. *Folia Histochem. Cytobiol*. 46, 383-388 (2008).
130. Maier M, Geiger EV, Henrich D, Bendt C, Wutzler S, Lehnert M, et al. Platelet factor 4 is highly upregulated in dendritic cells after severe trauma. *Mol Med*. 2009;15(11-12):384-91.
131. Elzey BD, Grant JF, Sinn HW, Nieswandt B, Waldschmidt TJ, Ratliff TL. Cooperation between platelet-derived CD154 and CD4+ T cells for enhanced germinal center formation. *J Leukoc Biol*. 2005;78(1):80-4.
132. Colman RW. Receptors that activate platelets. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1991;197(3):242-8.
133. Clawson CC, White JG. Platelet interaction with bacteria. I. Reaction phases and effects of inhibitors. *Am J Pathol*. 1971;65(2):367-80.
134. Clawson CC, White JG. Platelet interaction with bacteria. II. Fate of the bacteria. *Am J Pathol*. 1971;65(2):381-97.
135. Clawson CC. Platelet interaction with bacteria. 3. Ultrastructure. *Am J Pathol*. 1973;70(3):449-71.
136. Simonet M, Triadou P, Frehel C, Morel-Kopp MC, Kaplan C, Berche P. Human platelet aggregation by *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by invasin. *Infect Immun*. 1992;60(2):366-73.
137. Mandell GL, Hook EW. The interaction of platelets, *Salmonella*, and mouse peritoneal macrophages. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1969;132(2):757-9.

138. Timmons S, Huzoor A, Grabarek J, Kloczewiak M, Hawiger J. Mechanism of human platelet activation by endotoxic glycolipid-bearing mutant Re595 of *Salmonella minnesota*. *Blood*. 1986;68(5):1015-23.
139. Copley AL, Maupin B, Balea T. The agglutinant and adhesive behaviour of isolated human and rabbit platelets in contact with various strains of mycobacteria. *Acta Tuberc Scand*. 1959;37:151-61.
140. Youssefian T, Drouin A, Masse JM, Guichard J, Cramer EM. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood*. 2002;99(11):4021-9.
141. Coutinho IR, Berk RS, Mammen E. Platelet aggregation by a phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *Thromb Res*. 1988;51(5):495-505.
142. Machado GB, de Assis MC, Leao R, Saliba AM, Silva MC, Suassuna JH, et al. ExoU-induced vascular hyperpermeability and platelet activation in the course of experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumosepsis. *Shock*. 2010;33(3):315-21.
143. Shepel M, Boyd J, Luider J, Gibb AP. Interaction of *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* with platelets. *J Med Microbiol*. 2001;50(12):1030-8.
144. Solomon Tsegaye T, Gnirss K, Rahe-Meyer N, Kiene M, Kramer-Kuhl A, Behrens G, et al. Platelet activation suppresses HIV-1 infection of T cells. *Retrovirology*. 2013;10:48.
145. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 1995;270(5243):1811-5.
146. Love MS, Millholland MG, Mishra S, Kulkarni S, Freeman KB, Pan W, et al. Platelet factor 4 activity against *P. falciparum* and its translation to nonpeptidic mimics as antimalarials. *Cell Host Microbe*. 2012;12(6):815-23.
147. Perkhofer S, Kainzer B, Kehrel BE, Dierich MP, Nussbaumer W, Lass-Flörl C. Potential Antifungal Effects of Human Platelets against *Zygomycetes* In Vitro. *J Infect Dis*. 2009 October 1;200(7): 1176-1179.
148. Robert R, Nail S, Marot-Leblond A, Cottin J, Miegerville M, Quenouillere S, Mahaza C, Senet JM. Adherence of Platelets to *Candida* Species In Vivo. *Infection and Immunity*. 2000;68(2):570-576.
149. Maish, P. A., and R. A. Calderone. Adherence of *Candida albicans* to a fibrin-platelet matrix formed in vitro. *Infect. Immun*. 1980;27:650–656.
150. Maish, P. A., and R. A. Calderone. Role of the surface mannan in the adherence of *Candida albicans* to fibrin-platelet clots formed in vitro. *Infect. Immun*. 1981;32:92–97.
151. Skerl, K. G., R. A. Calderone, and T. Sreevalsan. Platelet interaction with *Candida albicans*. *Infect. Immun*. 1981;34:938–943.
152. Klotz, S. Adherence of *Candida albicans* to components of the subendothelial extracellular matrix. *FEMS Microbiol. Lett*. 1990;68:249–254.



153. Klotz, S., J. Harrison, and R. Misra. Aggregated platelets enhance adherence of *Candida* yeasts to endothelium. *J. Infect. Dis.* 1989;160:669–677.
154. Yeaman, M. R., A. S. Ibrahim, J. E. Edwards, A. S. Bayer, and M. A. Ghannoum. Thrombin induced rabbit platelet microbicidal protein is fungicidal in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993;37:46–553
155. Yeaman, M. R., S. S. Soldan, M. A. Ghannoum, J. E. Edwards, S. G. Filler, and A. S. Bayer. Resistance to platelet microbicidal protein results in increased severity of experimental *Candida albicans* endocarditis. *Infect. Immun.* 1996;64:1379–1384.
156. Yeaman, M. R., Y. Q. Tang, A. J. Shen, A. S. Bayer, and M. E. Selsted. Purification and in vitro activities of rabbit platelet microbicidal proteins. *Infect. Immun.* 1997;65:1023–1031.
157. Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Presterl E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses* 55(3):199–204, 2012.
158. Sarazin A, Poulain D, Jouault T., In vitro pro- and anti-inflammatory responses to viable *Candida albicans* yeasts by a murine macrophage cell line. *Med Mycol.* 2010;48(7):912-921.
159. Molero G, Díez-Orejas R, Navarro-García F, et al., *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol.* 1998;1(2):95-106.
160. Demirbilek M., Timurkaynak F., Can F., Azap Ö., Arslan H., Hastane kaynaklı *Candida* türlerinde biyofilm oluşumu ve antifungal duyarlılık paternleri, *Mikrobiyol Bült* 2007; 41:261-269.
161. Şenol E. *Candida* Enfeksiyonlarının Patogenezi, Bamçag Mantar Sempozyumu II, Kuşadası, Aydın: *Candida Özet Kitabı*, 2011; 8-10.
162. Yarar M. Klinik Materyallerden İzole Edilen *Candida albicans* Suşlarında SAP genlerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Denizli, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; 2014.
163. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, da Cruz Pacheco I, Correa do Amaral RJ, Granjeiro JM, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(3):67.
164. Willcox MDP, Webb BC, Thakur A, Harty DWS. Interactions between *Candida* species and platelets. *J. Med. Microbiol.* 1998;47: 103-110.
165. Mariani E, Filardo G, Canella V, Berlingeri A, Bielli A, Cattini L, et al. Platelet-rich plasma affects bacterial growth in vitro. *Cytotherapy.* 2014;16(9):1294-304.
166. Anitua E, Alonso R, Girbau C, Aguirre JJ, Muruzabal F, Orive G. Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF(R)-Endoret(R)) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains. *Clin Exp Dermatol.* 2012;37(6):652-7.
167. Yang LC, Hu SW, Yan M, Yang JJ, Tsou SH, Lin YY. Antimicrobial activity of platelet-rich plasma and other plasma preparations against periodontal pathogens. *J Periodontol.* 2015;86(2):310-8.

168. Drago L, Bortolin M, Vassena C, Taschieri S, Del Fabbro M. Antimicrobial activity of pure platelet-rich plasma against microorganisms isolated from oral cavity. *BMC Microbiol.* 2013;13:47.
169. Moojen DJ, Everts PA, Schure RM, Overdeest EP, van Zundert A, Knape JT, et al. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res.* 2008;26(3):404-10.
170. Gear ARL, Camerini D. Platelet Chemokines and Chemokine Receptors: Linking Hemostasis, Inflammation, and Host Defense. *Microcirculation.* (2003) 10, 335–350.
171. Boehlen F, Clemetson KJ. Platelet chemokines and their receptors: what is their relevance to platelet storage and transfusion practice? *Transfusion Medicine.* 2001; 11: 403 – 417.
172. Huff T, Otto AM, Müller CSG, Meier M, Hannappel E. Thymosin  $\beta$ 4 is released from human blood platelets and attached by factor XIIIa (transglutaminase) to fibrin and collagen. *The FASEB Journal.* 2002;16:691-696.

# ÖZGEÇMİŞ

## I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Berksan ŞİMŞEK  
Doğum yeri ve tarihi : Ankara, 30.12.1981  
Uyruğu : T.C.  
Medeni durumu : Evli  
İletişim adresi ve telefonu : Okmeydanı EAH Kasımpaşa Ek Bina  
Transfüzyon Merkezi Beyoğlu-İstanbul,  
05053326654  
Yabancı dili : İngilizce

## II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

2012-2008 Tıpta Uzmanlık Eğitimi GATA Tıbbi Mikrobiyoloji A.B.D. Dalı  
2005-1999 Lisans (Tıp Fakültesi) GATA  
1999-1996 Lise Kuleli Askeri Lisesi  
1996-1992 Ortaokul Çankaya Milli Piyango Anadolu Lisesi  
1992-1987 İlkokul Çiğiltepe İlköğretim Okulu

## III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)

2005-2008 Pratisyen Doktor  
2008-2012 Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanlık Öğrencisi  
2012- Uzman Doktor

#### IV- Mesleki Deneyimi

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Stajyer Tbp.	GATA Stajyer ve Kurs Brl.K.	2005-2006
Tabip Subayı	TCG İskenderun Komutanlığı	2006-2008
Uzmanlık Öğrencisi	GATF Eğitim Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD.Bşk.	2008-2012
Uzman Doktor	Kasımpaşa Asker Hastanesi Baştabipliği Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi	2012-2016
Uzman Doktor	Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kasımpaşa Ek Binası Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi	2016-

#### V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti (TMC)

Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği (KLİMUD)

KLİMUD Genç Uzman Komisyonu

KLİMUD Cinsel Yolla Bulaşan Enfeksiyonlar Çalışma Grubu

Türkiye Kan Merkezleri ve Transfüzyon Derneği (TKMTD)

#### VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları: (Ulusal ya da uluslararası makale, bildiri, poster, kitap/kitap bölümü vb.)

##### A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Frequency and genotyping of human papillomavirus in pap smear samples.  
B. Simsek, K. Sener, M. Yapar, M. Dede, A. Kubar.  
Journal of clinical virology, volume 46, supplement 1, september 2009, 18.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532\(09\)70095-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532(09)70095-2)
2. A case of Cryptococcus neoformans meningitis in a patient with abnormal levels of isolated immunological markers.  
Simsek B, Guven E, Gumral R, Mert G, Saracli MA, Besirbellioglu B, Yildiran ST.  
J Mycol Med. 2016 Sep;26(3):283-5. doi: 10.1016/j.mycmed.2016.05.003. Epub 2016 Jul 8.

3. A Case of Alveolar Echinococcosis Presenting as Cerebral and Spinal Intradural Metastases.  
Atalan G, Sivrioglu AK, Sönmez G, Celik M, Simsek B.  
Eurasian J Med. 2016 Jun;48(2):149-52. doi: 10.5152/eurasianjmed.2015.15003.
4. Fluoride-Containing Anti-caries pH-Sensitive Release System and its Effect on *Streptococcus mutans*  
Günseli Güven Polat, Özlem Martı Akgün, Berksan Şimşek, Mehmet Ali Saraçlı, Senem Heper, Vasif Hasırcı.  
Fluoride 49(4 Pt 1):393-401 October-December 2016.
5. The value of indirect serum markers in predicting severity of fibrosis in treatment naïve patients with non-cirrhotic hepatitis C virus infection  
Murat Afyon, Cumhuri Artuk, Ercan Yenilmez, Berksan Simsek, Ayper Kaya  
Medicine Science International Medical Journal doi: 10.5455/medscience.2016.05.8533  
Med Science 2017;6(2):189-94.
6. Platelet-rich plasma as an additional therapeutic option for infected wounds with multi-drug resistant bacteria. In vitro antibacterial activity study  
Rıza Aytaç Çetinkaya<sup>1</sup> · Ercan Yenilmez<sup>1</sup> · Patrizio Petrone<sup>2,9</sup> · Soner Yılmaz<sup>3</sup> · Bayhan Bektöre<sup>4</sup> · Berksan Şimşek<sup>5</sup> · Tuğba Kula Atik<sup>6</sup> · Mustafa Özyurt<sup>7</sup> · Aytekin Ünlü<sup>8</sup>  
European Journal of Trauma and Emergency Surgery <https://doi.org/10.1007/s00068-018-0957-0>

**B. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:**

1. Şüpheli servikal lezyonlu kadınlarda yüksek riskli HPV'lerin genotip dağılımı.  
Fatih Şahiner, Kenan Şener, Mehmet Yapar, Murat Dede, Nuri Yiğit, Berksan Şimşek, Ayhan Kubar.  
Gülhane Tıp Dergisi, Aralık 2012, Cilt 54, Sayı 4, 298.
2. Evaluation of Platelet Indices in Young Male Patients with Hepatitis C  
Hepatit C Enfeksiyonu Olan Genç Erkek Hastalarda Platelet Parametrelerinin Değerlendirilmesi  
Murat Afyon, Cumhuri Artuk, Ercan Yenilmez, Berksan Şimşek, Ayper Kaya  
J Clin Anal Med 2016;7(5): 706-10. DOI: 10.4328/JCAM.4537
3. A Case of Chronic Hepatitis B Virus Infection in an Anti-HBc negative Patient: An Atypical Serological Profile  
Atipik Serolojik Profil Olarak Anti-HBc Negatif Kronik Hepatit B Virüs Enfeksiyonu Olgusu  
Murat AFYON, Berksan ŞİMŞEK, Ayper KAYA  
Viral Hepatitis Journal 2016; 22(1):34-36. Doi: 10.4274/vhd.98159
4. Kronik hepatit B virus enfeksiyonu olan 18-30 yaş arası erkek hastalarda hepatit seroprevalansı  
Murat Afyon, Berksan Şimşek.  
Gülhane Tıp Derg 2016;58:373-376. doi:10.5455/Gülhane.212062
5. Assessment of laboratory indices for predicting severity of fibrosis in treatment naive young male patients with non-cirrhotic hepatitis B virus infection.  
Murat Afyon, Cumhuri Artuk, Ercan Yenilmez, Berksan Şimşek, Ayper Kaya.  
Cukurova Med J 2017; 42(2): 299-307. DOI: 10.17826/cutf.322924
6. Evrensel Kan Ürünleri  
Berksan Şimşek, İsmail Yaşar Avcı.  
İKSST Derg 10(1):1-6,2018. DOI:10.5222/iksst.2018.001
7. Deniz Harp Okulu Öğrencileri ve Personelinde Hepatit A Virüs Enfeksiyonuna Duyarlılığın Araştırılması  
Evaluation of susceptibility to hepatitis a virus infection in naval academy students and staff

**C. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:**

1. Antimicrobial Resistance of Nosocomial Gram-Negative Bacteria in Gulhane Military Medical Academy Hospital Intensive Care Units.  
B. SIMSEK, O. BEDIR, R. GUMRAL, A. KILIC, A. BASUSTAUGLU.  
50th ICAAC program kitabı, 17.
2. Achromobacter xylosoxidans Keratitis in a Therapeutic Soft Contact Lens Wearer.  
Berksan SIMSEK, Umit YOLCU, Alfrida PELLUMBI, Volkan HURMERIC, Orhan BEDIR, Abdullah KILIC, Mehmet A. SARACLI, Ahmet C. BASUSTAUGLU.  
European Journal of Microbiology&Immunology, Volume 1, Number 2, 171.
3. Retrospektif Olarak Antinükleer Antikor Pozitif Olan Hastalarda İndirekt İmmüno Floresan (İİF) ve İmmüno Blotting (İB) Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi.  
Berksan Şimşek, Hacer Mısırlıoğlu, Sema Ören, Uğur Muşabak, Mehmet Baysallar, Ahmet Başustaoglu  
Turkish Journal of Immunology, Volume:1, Number:15, Supplement(21th congress of immunology-abstract book), 111.
4. Anti-Gliadin (AGA) ve Anti Doku Transglutaminaz (tTG) Sonuçlarının Retrospektif Değerlendirilmesi  
Berksan Şimşek, Hacer Mısırlıoğlu, Sema Ören, Uğur Muşabak, Mehmet Baysallar, Ahmet Başustaoglu.  
Turkish Journal of Immunology, Volume:1, Number:15, Supplement(21th congress of immunology-abstract book), 111.
5. A Case of Ankle Joint Tuberculosis.  
Berksan Simsek, Ahmet Burak Bilekli, Gulin Rodoplu, Ozgul Kisa, Ali Albay.  
32nd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, Program kitabı, 91.
6. Supraclavicular cutaneous abscess caused by M. tuberculosis complex: Case Report.  
Gulin Rodoplu, Hasan Huseyin Arslan, Berksan Simsek, Turan Ilica, Ozgul Kisa, Ali Albay.  
32nd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, program kitabı, 90.
7. Expression of Hepatitis B virus "e" antigen gene region in yeast.  
Berksan Şimşek, Kenan Şener, Mehmet Yapar, Fatih Şahiner, Ayhan Kubar  
Journal of Antivirals&Antiretrovirals, August 2012 Volume 4, Issue 4, 175.
8. New-Developed Anti-caries pH-Sensitive Release System and its Effect on *Streptococcus mutans*  
Günseli Güven Polat, Özlem Martı Akgün, Berksan Şimşek, Mehmet Ali Saraçlı, Senem Heper, Vasif Hasırcı.  
21.TDA International Dental Congress, EXPODENTAL 2015, 28-30 Mayıs 2015, P091, Kongre Programı ve Özetler,357.
9. Evaluation And Comparison Of In Vitro Hemostatic Functions Of Apheresis Vs Random- Donor Platelet Concentrates Via Thrombin Generation Test  
İbrahim Eker, Rıza Aytaç Çetinkaya, Soner Yılmaz, Aytakin Ünlü, Ercan Yenilmez, Tuğba Kula Atik, Bayhan Bektöre, Berksan Şimşek, Ümit Savaşçı, Ertuğrul Yazıcı, Orhan Gürsel, Sebahattin Yılmaz, İsmail Yaşar Avcı  
XII<sup>th</sup> Annual Conference of Asian Association of Transfusion Medicine (2-6 April 2016), Kongre kitabı, 258.

10. A New Alternative For Prehospital Hemorrhagic Shock Resuscitation: Lyophilized Plasma  
Soner Yılmaz, Ibrahim Eker, Rıza Aytaç Çetinkaya, Ercan Yenilmez, Aytekin Ünlü, Bayhan Bektöre, Tuğba Kula Atik, Turan Bayhan, Berksan Şimşek, Burcu Eser, Ertuğrul Yazıcı, Orhan Gürsel, Nazif Zeybek, Sebahattin Yılmaz, Mehmet Ali Saraçlı, İsmail Yaşar Avcı  
XII<sup>th</sup> Annual Conference of Asian Association of Transfusion Medicine (2-6 April 2016),  
Kongre kitabı, 263.
11. Weak D Detection Rates In A Blood Center From Blood Donors  
Bayhan Bektöre, Tuğba Kula Atik, Ercan Yenilmez, Berksan Şimşek, İlker Murat Şen, Gökhan Öziz, Rıza Aytaç Çetinkaya  
XII<sup>th</sup> Annual Conference of Asian Association of Transfusion Medicine (2-6 April 2016),  
Kongre kitabı, 295.
12. Distribution Of Blood Groups Among Blood Donors In A Blood Center Of A Training Hospital  
Tuğba Kula Atik, Bayhan Bektöre, Ercan Yenilmez, Berksan Şimşek, İlker Murat Şen,  
Rıza Aytaç Çetinkaya  
XII<sup>th</sup> Annual Conference of Asian Association of Transfusion Medicine (2-6 April 2016),  
Kongre kitabı, 296.
13. Newborn Blood Group Detection Rates  
Bayhan Bektöre, Tuğba Kula Atik, Ercan Yenilmez, Berksan Şimşek, Rıza Aytaç Çetinkaya  
XII<sup>th</sup> Annual Conference of Asian Association of Transfusion Medicine (2-6 April 2016),  
Kongre kitabı, 297.
14. Distribution Of Blood Groups Among Patients In A Blood Center Of A Training Hospital During  
Five Years Period  
Bayhan Bektöre, Tuğba Kula Atik, Ercan Yenilmez, Berksan Şimşek, Rıza Aytaç Çetinkaya  
XII<sup>th</sup> Annual Conference of Asian Association of Transfusion Medicine (2-6 April 2016),  
Kongre kitabı, 297.

**D. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:**

1. Bir Eğitim Hastanesi Yoğun Bakım Ünitelerinden Gelen Kan Kültürlerinden İzole Edilen Enterobacteriaceae Üyesi Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılık Durumları Ve Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Sıklığı.  
Yeşim MAÇKAN, Berksan ŞİMŞEK, Orhan BEDİR, Abdullah KILIÇ, Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU.  
Gülhane Mikrobiyoloji Günleri, 20-22 nisan 2010, program ve özet kitabı, 245-246.
2. Kan kültürlerinden izole edilen Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca ve Proteus mirabilis izolatlarının antibiyotik duyarlılık durumları ve Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz pozitiflik sıklığı.  
Berksan ŞİMŞEK, Orhan BEDİR, Ramazan GÜMRAL, Abdullah KILIÇ, Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU.  
Gülhane Mikrobiyoloji Günleri, 20-22 nisan 2010, program ve özet kitabı, 247-248.
3. Şüpheli Genital Lezyonlu Kadınlarda Yüksek Riskli HPV'lerin Genotip Dağılımı.  
Fatih Şahiner, Kenan Şener, Mehmet Yapar, Berksan Şimşek, Ayhan Kubar.  
4. Ulusal Viroloji Kongresi, Kongre Kitabı, 175.
4. İmmünolojik belirteç seviyeleri anormal olarak saptanan bir bireyde gözlenen Cryptococcus neoformans menenjit  
Şinasi Taner Yıldırım, Ramazan Gümrall, Berksan Şimşek, Mehmet Ali Saraçlı.  
I. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı.

5. Ülkemizde Kuduz Tarihçesi  
Serhat Duyan, Orhan Bedir, Berksan Şimşek, Ahmet Celal Başustaoğlu.  
I. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı.
6. GATF hastanesinde izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antimikrobiyal direnç oranlarının belirlenmesi  
Aylin Üsküdar Güçlü, Serhat Suyan, Berksan Şimşek, Mustafa Güney, Ramazan Gümral, Orhan Bedir  
10. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Program ve özet kitabı, 147.
7. GATA Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarının antibiyotik direnç durumlarının araştırılması.  
Kemal Tekin, Soner Yılmaz, Mustafa Güney, Berksan Şimşek, Orhan Bedir, Ahmet Celal Başustaoğlu  
10. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Program ve özet kitabı, 150.
8. Gülhane Askeri Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında 2010-2011 yıllarında izole edilen *Salmonella spp.* ve *Shigella spp.* suşlarının antibiyotik direnç durumları.  
Serhat Duyan, Berksan Şimşek, Mustafa Güney, Ramazan Gümral, Orhan Bedir, Ahmet Celal Başustaoğlu.  
10. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Program ve özet kitabı, 155.
9. 2011 yılında GATF Mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen *Enterobacteriaceae* türlerinin kliniklere göre dağılımı ve direnç durumu.  
Serhat Duyan, Mustafa Güney, Soner Yılmaz, Berksan Şimşek, Ramazan Gümral, Orhan Bedir.  
10. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Program ve özet kitabı, 157.
10. GATF hastanesinde izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılık durumları  
Berksan Şimşek, Mustafa Güney, Ramazan Gümral, Orhan Bedir, Abdullah Kılıç, Ahmet Celal Başustaoğlu  
35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı, 284.
11. İdrar kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları: İki yıllık gözlem  
Berksan Şimşek, Mete Tez.  
2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı, 240.
12. Gıda sektörü çalışanı 1480 vakada nazal sürüntü örneklerinin irdelenmesi  
Ercan Yenilmez, Murat Afyon, Berksan Şimşek, Asım Ülçay, Hakan Erdem  
5. Ekmud Bilimsel Platformu.
13. 2012-2015 Yılları Arasında İdrar Kültürlerinden İzole Edilen *Escherichia Coli* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları  
Berksan Şimşek  
3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı, 251.
14. Kan ve Kan Bileşenleri Kullanımında Sürekli Uyanık Mıyız? GATA Bölge Kan Merkezinde Hemovijilans Sisteminin Kurulması  
Ümit Savaşçı, Soner Yılmaz, Zahide Sezer, Ertuğrul Yazıcı, Berksan Şimşek, Gökhan Özgür, İbrahim Eker, İsmail Yaşar Avcı, Sebahattin Yılmaz, Levent Yamanel, Rıza Aytaç Çetinkaya  
VIII. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kongresi (14-18 Aralık 2015), Kongre kitabı, 283.
15. Hemovijilans Uygulamalarının İlk 6 Aylık Yansımaları Ne Bekliyorduk Ne Oldu?  
Zahide Sezer, Ümit Savaşçı, Soner Yılmaz, Ertuğrul Yazıcı, Berksan Şimşek, Gökhan Özgür, İbrahim Eker, İsmail Yaşar Avcı, Sebahattin Yılmaz, Levent Yamanel, Rıza Aytaç Çetinkaya



VIII. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi (14-18 Aralık 2015), Kongre kitabı, 285.

16. Aferez Ve Random Trombosit Süspansiyonlarının Hemostatik Etkilerinin Trombin Jenerasyon Testi İle Karşılaştırılması  
İbrahim Eker, Rıza Aytaç Çetinkaya, Soner Yılmaz, Aytekin Ünlü, Ercan Yenilmez, Tuğba Kula Atik, Bayhan Bektöre, Berksan Şimşek, Ümit Savaşçı, Ertuğrul Yazıcı, Orhan Gürsel, Sebahattin Yılmaz, İsmail Yaşar Avcı, Ahmet Emin Kürekçi  
5.Ulusal Pediatrik Hematoloji Sempozyumu (12-14 Mayıs 2016), Bildiri kitabı, 94

#### **E. Sözlü sunulan bildiriler**

1. Trombositten zengin plazmanın çoklu ilaç direncine sahip çeşitli bakteriler üzerine Antibakteriyel Etkinliğinin in-vitro araştırılması  
Rıza Aytaç Çetinkaya<sup>1</sup> · Ercan Yenilmez<sup>1</sup> · Patrizio Petrone<sup>2</sup> · Soner Yılmaz<sup>3</sup> · Bayhan Bektöre<sup>4</sup> · Berksan Şimşek<sup>5</sup> · Tuğba Kula Atik<sup>6</sup> · Mustafa Özyurt<sup>7</sup> · Aytekin Ünlü<sup>8</sup>  
XIX. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı, Sayfa 92-95.  
28-31 Mart 2018, Gloria Golf Resort, Antalya
2. Trombositten Zengin Plazma (TZP) ve Trombositten Fakir Plazma (TFP)'nin Çoklu İlaç Direncine Sahip *Acinetobacter Baumannii*'ye Karşı Antibakteriyel Etkinliğinin İn Vitro Araştırılması  
Rıza Aytaç Çetinkaya<sup>1</sup> · Ercan Yenilmez<sup>1</sup> · Soner Yılmaz<sup>2</sup> · Bayhan Bektöre<sup>3</sup> · Berksan Şimşek<sup>4</sup> · Tuğba Kula Atik<sup>5</sup> · Mustafa Özyurt<sup>6</sup> · İsmail Yaşar Avcı<sup>7</sup>  
XI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi Kongre Kitabı, Sayfa168-171.  
11-15 Mart 2018 , Side-Antalya

#### **F. Yazılan ulusal/uluslararası kitaplardaki bölümler:**

1. Biyoterörizm Ajanlarıyla Çalışırken Laboratuvarda Biyogüvenlik  
Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Biyogüvenlik, 288-303.
2. Personel Eğitimi  
Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Biyogüvenlik, 152-161.
3. Bakterilerin Genel Özellikleri  
Sağlık Bilimlerinde Mikrobiyoloji, 9-19.
4. İdrar Örneklerine Yaklaşım  
Hemşirelik Uygulamalarında Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları, 329-337

#### **G. Çeviriler:**

1. 9.7.1 Balgam: Direk Bakı ve Boyalı Preparasyon, Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı, Üçüncü Baskı.
2. 9.7.2 Aspiratlar ve Bronkoskopi Örnekleri, Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı, Üçüncü Baskı.
3. 3.17.39 Oksidaz Testi, Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı, Üçüncü Baskı.
4. 3.17.40.Fenilalanin Deaminaz Testi, Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı, Üçüncü Baskı.
5. 3.17.41 PYR (L-Pirolidonil-B-Naftilamid) Testi, Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı, Üçüncü Baskı.

## VII- Bilimsel Etkinlikleri

### Ödüller

1. “Kongre düzenlemede gösterilen başarı” takdir.  
Prof Dr. Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU  
GATA Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı
2. Poster Sunumu Birincilik Ödülü  
A New Alternative For Prehospital Hemorrhagic Shock Resuscitation: Lyophilized Plasma  
Soner Yılmaz, Ibrahim Eker, Rıza Aytaç Çetinkaya, Ercan Yenilmez, Aytekin Ünlü, Bayhan Bektöre, Tuğba Kula Atik, Turan Bayhan, Berksan Şimşek, Burcu Eser, Ertuğrul Yazıcı, Orhan Gürsel, Nazif Zeybek, Sebahattin Yılmaz, Mehmet Ali Saraçlı, İsmail Yaşar Avcı  
XII<sup>th</sup> Annual Conference of Asian Association of Transfusion Medicine (2-6 April 2016)
3. Sözlü Bildiri Üçüncülük Ödülü  
Trombositten Zengin Plazma (TZP) ve Trombositten Fakir Plazma (TFP)’nın Çoklu İlaç Direncine Sahip Acinetobacter Baumannii’ye Karşı Antibakteriyel Etkinliğinin İn Vitro Araştırılması  
Rıza Aytaç Çetinkaya1 • Ercan Yenilmez1 • Soner Yılmaz2 • Bayhan Bektöre3 • Berksan Şimşek4 • Tuğba Kula Atik5 • Mustafa Özyurt6 • İsmail Yaşar Avcı7  
XI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kongresi Kongre Kitabı, Sayfa168-171.  
11-15 Mart 2018, Side-Antalya
4. Sözlü Bildiri İkincilik Ödülü  
Trombositten zengin plazmanın çoklu ilaç direncine sahip çeşitli bakteriler üzerine Antibakteriyel Etkinliğinin in-vitro araştırılması  
Rıza Aytaç Çetinkaya1 • Ercan Yenilmez1 • Patrizio Petrone2 • Soner Yılmaz3 • Bayhan Bektöre4 • Berksan Şimşek5 • Tuğba Kula Atik6 • Mustafa Özyurt7 • Aytekin Ünlü8  
XIX. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi  
Kongre Kitabı, Sayfa 92-95.  
28-31 Mart 2018, Gloria Golf Resort, Antalya

## VIII- Diğer Bilgiler

### Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve katıldığı eğitim seminerleri

1. Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyansı ve Kontrolü Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi-II;  
Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar modülü (Kasım 2008)  
Parazitoloji modülü (Ocak 2009)  
Antimikrobiyal duyarlılık testlerimodülü (Ocak 2009)
2. Hastane İnfeksiyonları Eğitim Programı (Nisan 2009)
3. Tatarcık Humması Sempozyumu (Nisan 2009)
4. 12th Annual ESCV Meeting (Eylül 2009)
5. Temel Epidemiyoloji Kursu (Şubat 2010)
6. Hantavirüs Sempozyumu (Mart 2010)

7. Gülhane Mikrobiyoloji Günleri; Antimikrobiyal Kemoterapi, Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler (Nisan 2010)
8. 1.Ulusal HPV ve Kansere Sempozyumu (Nisan 2010)
9. 50. ICAAC (Eylül 2010)
10. Bildirimi Zorunlu Paraziter Hastalıklar Eğitimi-(Eğitimci olarak 2 defa) (Kasım-Aralık 2010)
11. Gıda ve Su Kaynaklı Enfeksiyon Etkenleri Eğitimi (Aralık 2010)
12. E-test kursu (Ocak 2011)
13. Clinical Implications of Antimicrobial Susceptibility Testing: ESCMID Postgraduate Technical Workshop (Mart 2011)
14. 21. Ulusal İmmünoloji Kongresi (Nisan 2011)
15. 1.Otoimmün Hastalıklarında Klinik ve Tanı Kursu (Nisan 2011)
16. 1<sup>st</sup> European Conference of Microbiology&Immunology (Mayıs 2011)
17. Tüberkülozda Temel Laboratuvar Tanı Teknikleri Eğitimi (Ekim 2011)
18. Bildirimi Zorunlu Paraziter Hastalıklar Uygulamalı Eğitimi-(Eğitimci olarak 3 defa) (Kasım-Aralık 2011)
19. 10. Antimikrobik Kemoterapi Günleri (Nisan 2012)
20. 2nd World Congress on Virology (Ağustos 2012)
21. 35.Türk Mikrobiyoloji Kongresi (Kasım 2012)
22. 2.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (Kasım 2013)
23. Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyansı ve Kontrolü Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi-III; LKYS Eğitimi (Mart 2014)
24. VII. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi Temel Kurs (Aralık 2014)
25. 3.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (Kasım 2015)
26. VIII. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi (Aralık 2015)
27. X. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi (Mart 2017)

### **Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar**

Gülhane Mikrobiyoloji Günleri 2010  
KLİMUD Giresun Bölge Toplantısı 2018

## EKLER

### Ek 1. Etik Kurul Kararı



T.C.  
SAĞLIK BAKANLIĞI  
Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

SAYI : HNEAH-KAEK 2017/374  
KONU : Araştırma Onay Başvurusu

13.03.2017

Sayın Yrd.Doç.Dr.Rıza Aytaç ÇETİNKAYA

Sorumlu araştırmacısı olduğunuz, SBÜ Sultan Abdülhamid Han Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD Servisi'nde yürütülmesi planlanan **“Trombositlerin Candida albicans Üzerine Antifungal Etkinliğinin Araştırılması”** başlıklı çalışmaya ait sunmuş olduğunuz başvuru dosyası ile ilgili belgeleri araştırmanın amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemleri yürürlükte bulunan “İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik” ve “Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği” dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın yürütülmesinde etik açıdan sakınca olmadığına 13.03.2017 tarihli toplantımızda oy birliğiyle HNEAH-KAEK 2017/24 (HNEAH-KAEK 2017/KK/24) karar no ile karar verilmiştir.

“İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik” ve “Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği” kapsamında yer alan araştırmalar için çalışmaya başlamadan önce Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu’ndan izin alınması gerekmektedir.

Araştırmada kullanılacak tüm ürünlerin ve tetkiklerin destekleyici, destekleyici yoksa araştırmacı tarafından karşılanması, destek alınacak ise desteği alınacak taahhüt edilen kurumun cevabi yazısının bir kopyasının araştırma başlamadan önce etik kurulumuza tarafınıza iletilmesi,

Araştırmanın başlamaması, iptali ve sonlandırılması halinde tarafımıza bilgi verilmesi,

Araştırmanın Helsinki Bildirgesi'nin son metni, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu ve İlgili mevzuata uygun olarak yürütülmesi,

Çalışma tamamlandığında tarafımıza bildirilmesi ve araştırmaya ait yıllık bildirim raporunun tarafımıza sunulması gerekmektedir.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. M. İhsan KARAMAN  
Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi  
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Ek: HNEAH Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu