



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

**ELAJİK ASİT, GALLİK ASİT, KAFEİK ASİT VE GÜMÜŞ
SÜLFADİAZİNİN KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN KANDİDA
TÜRLERİ ÜZERİNDEKİ İN VİTRO ETKİSİNİN FLUKONAZOL İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Rabia GÜNEY KAVUŞAK

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL
Mart, 2019

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

**ELAJİK ASİT, GALLİK ASİT, KAFEİK ASİT VE GÜMÜŞ
SÜLFADİAZİNİN KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN KANDIDA
TÜRLERİ ÜZERİNDEKİ İN VİTRO ETKİSİNİN FLUKONAZOL İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Rabia GÜNEY KAVUŞAK
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mustafa SAMASTI

İSTANBUL
Mart, 2019

ONAY

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Tıpta Uzmanlık Yönetmeliği hükümlerine göre uzmanlık eğitimi gören Rabia GÜNEY KAVUŞAK'ın hazırladığı ve jüri önünde savunduğu "ELAJİK ASİT, GALLİK ASİT, KAFEİK ASİT VE GÜMÜŞ SÜLFADIAZİNİN KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN KANDIDA TÜRLERİ ÜZERİNDEKİ İN VİTRO ETKİSİNİN FLUKONAZOL İLE KARŞILAŞTIRILMASI" başlıklı tez başarılı kabul edilmiştir.

UNVAN, AD VE SOYAD

KURUMU

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa SAMASTI

Üyeler:

.....

.....

.....

.....

.....

Tez Savunma Tarihi:

Yazar Bildirimi

"ELAJİK ASİT, GALLİK ASİT, KAFEİK ASİT VE GÜMÜŞ SÜLFADİAZİNİN KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN KANDİDA TÜRLERİ ÜZERİNDEKİ İN VİTRO ETKİSİNİN FLUKONAZOL İLE KARŞILAŞTIRILMASI" isimli uzmanlık tezinde Rabia GÜNEY KAVUŞAK

- Bu tezin kabulünden önce nerede ve ne kadarının yayınlandığını "Bilgilendirme" bölümünde belirtmiştir
- Tezin hazırlanmasında katkısı olanları "Bilgilendirme" bölümünde eksiksiz olarak belirtmiştir
- Bu tez ile ilgili çıkar çatışması olup olmadığını "Bilgilendirme" bölümünde belirtmiştir
- Tez içerisinde başkalarının yayınlanmış veya yayınlanmamış çalışmalarından yapılan alıntılar için gerekli kaynakları açıkça belirtmiştir
- Tez içerisinde başka kaynaklardan kopyalanmış olan kısımları tırnak içerisine alarak ve izin alınan kaynağı belirterek kullanmıştır

Mart, 2019

İmza:

- Bu çalışmada adı geçen ilaç, tıbbi cihaz ve laboratuvar malzemelerinin üreticileri ile herhangi bir çıkar ilişkim yoktur.
- Bu tez çalışması daha önce hiçbir yerde yayınlanmamıştır.

Rabia GÜNEY KAYMAK



Teşekkür

Gerçekleştirmiş olduğum tez çalışmasında bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren kıymetli hocam Prof. Dr. Mustafa Samastı'ya; Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Esra Koçoğlu'na,

Çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen Uz. Dr. Deniz Turan ve Yar. Doç. Dr. Zafer Habip'e,

Asistanlık eğitimim boyunca manevi destekleri ve tecrübeleri ile bana yardımcı olan sevgili dostlarım Uz. Dr. Zeynep Kayra Tanrıverdi, Uz. Dr. Leyla Yılmaz, Uz. Dr. Eda Kayhan ve Uz. Dr. Gamze Çiftçi'na ve Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesinde mikrobiyoloji ve biyokimya asistanı olarak çalışmakta olan arkadaşlarıma,

Hayat boyu karşılaştığım zorluklarda beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan canım anne-babama, kardeşlerime, kardeş gibi gördüğüm arkadaşlarıma ve bu süreçte en büyük destekçim, eşim Mustafa Kavuşak'a

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Rabia Güneş Kavuşak
rabiaguney@hotmail.com

Özet

ELAJİK ASİT, GALLİK ASİT, KAFEİK ASİT VE GÜMÜŞ SÜLFADİAZİNİN KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN KANDİDA TÜRLERİ ÜZERİNDEKİ İN VİTRO ETKİSİNİN FLUKONAZOL İLE KARŞILAŞTIRILMASI

AMAÇ. Bu çalışmada; fenolik asit türevlerinden elajik asit, gallik asit ve kafeik asit ile gümüş sulfadiazinin kandida türleri üzerindeki antifungal etkinliklerinin araştırılarak flukonazol ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEM. Çalışmada farklı hastaların kan kültürü örneklerinden izole edilmiş 30 kandida kökeni (8 *C.albicans*, 8 *C.parapsilosis*, 8 *C.tropicalis*, 4 *C.glabrata* ve 2 *C.krusei*) ile standart bir *C.krusei* kökeni (ATCC 6258) kullanılmıştır. Antifungal etkinliğin belirlenmesi için mikrodilüsyon ve disk difüzyon testleri kullanılmıştır.

BULGULAR. MİK 50 değerlerine göre gümüş sulfadiazin tüm kökenlere düşük MİK değerlerinde (0,78-1,56 µg/ml) etkili bulunmuş; flukonazol ise *C.krusei* dışındaki tüm kökenler üzerinde benzer etki (MİK değerleri 0,78-3,125 µg/ml) göstermiştir. Elajik asit denediğimiz kökenlerin çoğuna etkili bulunmuştur. Elajik asit için MİK değerleri *C.krusei* ve *C.glabrata* için 0,78 µg/ml, *C.parapsilosis* için 3,125 µg/ml, *C.tropicalis* için 0,78-50 µg/ml ve *C.albicans* için 1,56-50 µg/ml bulunmuştur. Gallik asit ve kafeik asit ise ancak belirli kökenlere sınırlı olmak üzere düşük seviyede etkinlik gösterebilmiştir.

SONUÇ. Elde ettiğimiz sonuçlara göre gümüş sulfadiazin, flukonazol ve elajik asit kandida türlerine yüksek düzeyde etkili bulunmuş, gallik asit ve kafeik asit ise düşük seviyede ve sınırlı etkinlik göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Elajik asit; Gallik asit; Kafeik asit; Gümüş sulfadiazin; Kandida türleri

Abstract

IN VITRO EFFECTS OF ELLAGIC ACID, GALLIC ACID, CAFFEIC ACID AND SILVER SULFADIAZINE ON THE CANDIDA SPECIES ISOLATED FROM BLOOD CULTURES AND COMPARISON WITH FLUCONAZOLE

OBJECTIVE. In this study; it is aim to investigate by comparing with flukonazole the antifungal effects of phenolic acid species ellagic acid, gallic acid, caffeic acid and silver sulfadiazine on candida species.

METHODS. In the study, it is used the 30 candida strains (8 *C.albicans*, 8 *C.parapsilosis*, 8 *C.tropicalis*, 4 *C.glabrata* and 2 *C.krusei*) isolated from blood cultures of diffrent patients and a standard *C.krusei* strain (ATCC 6258). For determaning antifungal activity microdilution and disc diffusion tests are used.

RESULTS. According to MIC-50 values, silver sulfadiazine is found effective at low MIC values (0,78-1,56 µg/ml) for all strains and also fluconazole showed similar effect (MIC values 0,78-3,125 µg/ml) on all strains except *C.krusei*. Ellagic acid, is found effective for most of the strains we have tried. For ellagic acid, MIC values are found 0,78 µg/ml for *C.krusei* and *C.glabrata*, 3,125 µg/ml for *C.parapsilosis*, 0,78-50 µg/ml for *C.tropicalis* and 1,56-50 µg/ml for *C.albicans*. Gallic acid and caffeic acid are able to exhibit only at low level and limited activity to certain strains.

CONCLUSION. Depend on our experiments; silver sulfadiazine, fluconazole and ellagic acid are found to be highly effective against the candida strains we tried and also gallic acid and caffeic acid showed low level and limited efficacy.

Keywords : Ellagic acid; Gallic acid; Kaffeic acid; Silver sulfadiazine; Candida species

İçindekiler

Şekil Listesi	ix
Tablo Listesi	x
Kısaltmalar	xi
1 GİRİŞ ve AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	2
2.1 KANDİDA TÜRLERİ	2
2.1.1 Kandidaların üreme koşulları	3
2.1.2 Hücre duvarı ve antijenik yapı	3
2.1.3 Kandidalara karşı immün yanıt	4
2.2 PATOGENEZ VE VİRÜLANS FAKTÖRLERİ	5
2.2.1 Adezyon	5
2.2.2 Mantar hücre yüzey hidrofobisitesi	6
2.2.3 Maya-hif dönüşümü	6
2.2.4 Fenotipik değişim	6
2.2.5 Enzimler	7
2.3 KANDİDA ENFEKSİYONLARI	7
2.3.1 Yüzeysel Kandida Enfeksiyonları	8
2.3.2 İnvazif Kandida Enfeksiyonları	9
2.4 KANDİDA ENFEKSİYONLARINDA TANI YÖNTEMLERİ	10
2.4.1 Klinik Örnekten Direkt Mikroskopik Bakı	11
2.4.2 Kültür	11
2.4.3 Kültür Dışı Tanı Yöntemleri	13
2.4.3.1 Serolojik Tanı	13
2.4.3.2 Metabolitlerin tayini	14
2.4.3.3 Nükleik asit tayini	14
2.4.3.4 MALDI-TOF MS:	14
2.5 KANDİDA ENFEKSİYONLARINDA KULLANILAN İLAÇLAR	15
2.5.1 Azoller	15
2.5.2 Ekinokandindler	15
2.5.3 Poliyenler	16
2.5.3.1 Amfoterisin B	16
2.5.3.2 Nistatin	16
2.5.4 Nükleozit analogları	16
2.6 FENOLİK BİLEŞİKLER	16
2.6.1 Elajik asit	18
2.6.2 Gallik asit	20
2.6.3 Kafeik asit	21
2.7 GÜMÜŞ VE GÜMÜŞ BİLEŞİKLERİ	23
2.7.1 Gümüş sülfadiazin	26
2.8 ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ	27

2.8.1 Makrodilüsyon	27
2.8.2 Mikrodilüsyon	28
2.8.3 Kolorimetrik mikrodilüsyon	28
2.8.4 Disk difüzyon	29
2.8.5 E test	29
3 YÖNTEM	30
3.1 ÇALIŞMANIN TASARIMI	30
3.2 ÇALIŞMA	30
3.3 İSTATİSTİK YÖNTEMLER	34
4 BULGULAR	35
4.1 Mikrodilüsyon testi sonuçları	35
4.2 Ortalama MİK değerleri	35
4.3 Disk difüzyon testi sonuçları	35
5 TARTIŞMA ve SONUÇ	39
5.1 TARTIŞMA	39
5.2 TEZİN KISITLILIKLARI	43
5.3 SONUÇ	44
Kaynaklar	45
Etik Kurul Onay Formu	56

Şekil Listesi

2.1 SDA besiyerinde <i>Candida krusei</i> ve <i>Candida albicans</i> 'ın koloni görünümü	12
2.2 Direkt mikroskopik bakı ile kandidalarda blastokonidyum, germ tüp ve yalancı hif görünümü	12
2.3 Elajik asitin kimyasal yapısı	18
2.4 Gallik asitin kimyasal yapısı	21
2.5 Kafeik asitin kimyasal yapısı	22
2.6 Kafeik asit - demir (III) şelat yapısı	23
3.1 Mikroplakalardaki 1-10 numaralı kuyucuklar için gerekli konsantrasyonların hazırlanması	32

Tablo Listesi

3.1 Flukonazol, Elajik asit, Gallik asit, Kafeik asit ve Gümüş sülfadiazinin özellikleri	31
4.1 24 saatlik inkübasyon sonrası flukonazol, elajik asit, gallik asit, kafeik asit ve gümüş sülfadiazinin <i>C.krusei</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.tropicalis</i> , <i>C.parapsilosis</i> ve <i>C.albicans</i> için %50 ve %100 üreme inhibisyonu sağlayan MİK değerleri ($\mu\text{g/ml}$)	36
4.2 Elajik asit, gallik asit, kafeik asit ve gümüş sülfadiazinin MİK aralığı ($\mu\text{g/ml}$) ve ortalama MİK değerleri ($\mu\text{g/ml}$)	37
4.3 Elajik asit, gallik asit, kafeik asit ve gümüş sülfadiazinin disk difüzyon testi sonucu ölçülen zon çapları (mm)	38

CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
DMSO	Dimetil sülfoksit
EA	Elajik asit
ELİSA	Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi
EUCAST.....	EAvrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
FLZ	Flukonazol
GA.....	Gallik Asit
GSD	Gümüş Sülfadiazin
KA	Kafeik Asit
MALDI-TOF MS.....	Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyonu - Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MOPS.....	Morfolin Propan Sulfonik Asit
µl	Mikrolitre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

GİRİŞ ve AMAÇ

Kandida türleri insanda fırsatçı enfeksiyonlara neden olan önemli bir mantar grubudur. Bağışıklığı baskılanmış hasta popülasyonunun artışına paralel şekilde bu enfeksiyonların sıklığında ve şiddetinde artış görülmektedir. Nozokomiyal enfeksiyon etkenleri arasında da kandida türleri giderek ön plana çıkmaktadır. Kandida türleri içerisinde *Candida albicans* en sık enfeksiyon etkeni olmakla birlikte *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis* ve *C.krusei* gibi kandidalar da giderek artan sıklıkta enfeksiyon oluşturmaktadır.

Kandida enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilen sınırlı sayıdaki antifungallere karşı direnç gelişiminin yanısıra bu ilaçların toksik yan etkileri ve özellikle biyofilm oluşumuna bağlı tedavi başarısızlıkları yeni tedavi alternatiflerinin geliştirilmesini zorunlu hale getirmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda doğal, kolay ulaşılabilir ve uygun maliyetli bitkisel özlerin antifungal özellikleri sıklıkla test edilmektedir. Fenolik asitler de mantarlar üzerindeki etkisi merak edilen ve çalışmaları hala devam eden bitkisel maddelerdendir.

Bizim çalışmamızda hastanemizde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilmiş kandida kökenlerine elajik asit, gallik asit, kafeik asit gibi fenolik asitlerin ve gümüş sülfadiazinin in vitro antifungal etkinliğinin mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri ile araştırılması hedeflenmiştir.

GENEL BİLGİLER

Dünyadaki toplam ökaryotik türlerin sayısı yaklaşık 8,7 milyon olarak tahmin edilirken mantarlar bu miktarın yaklaşık % 7'sine tekabül etmektedir (611.000 tür). Mantarlar arasında 600 kadar türün insan patojeni olduğu tahmin edilmektedir. Patojen mantarlar insanda yüzeysel cilt enfeksiyonlarından cilt ve cilt altı dokuların invazif enfeksiyonlarına ve nihayet yaşamı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara kadar değişebilen klinik tablolara neden olabilmektedir (1).

Kandida türleri doğumdan itibaren insanın cilt ve mukozalarında kolonize olabilen önemli insan patojenleridir. Kolonizasyon durumu vücut direncinin ve fizyolojik dengelerin bozulmasıyla kolaylıkla enfeksiyonlara dönüşebilmektedir. Örneğin kadınların %75'inde yaşam boyu en az bir kez ve çok defasında tekrarlamalar gösteren vajinal kandidiyaz görülmektedir. Buna karşılık bağışıklığı baskılanmış hastaların çoğunda orofaringeal kandidiyaz ortaya çıkmaktadır (2). Son yıllarda immün düşkün hastaların sayıca artışına ve gereğinden fazla geniş spektrumlu antibiyotik kullanımına bağlı olarak kandida enfeksiyonları gittikçe artmaktadır. Takribi 200 kadar türü bulunan kandidaların yaklaşık %10'u insanda enfeksiyon yapabilmekle birlikte bu enfeksiyonların %90'ında 5 tür (*C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata* ve *C.krusei*) etken olarak rol oynamaktadır (3, 4).

Yeni epidemiyolojik çalışmalar, kandidiyaz sıklığının 100.000'de 1,2 ile 25 arasında değiştiğini göstermektedir. Buna karşılık kandidemiye bağlı mortalite oranı yaklaşık %40 olarak bildirilmektedir (5).

2.1. KANDİDA TÜRLERİ

Kandida türleri, filogenetik analizlere göre en büyük mantar grubu olan Ascomycotina'ların Saccharomycotina alt bölümünde yer alırlar (3). Klinik örneklerde ve kültürde 3-6 mikrometre (µm) boyunda, oval ya da

yuvarlağımsı, tomurcuklanan hücreler (blastokonidyum veya blastosporlar) şeklinde bulunurlar. Özel kültür ortamında tomurcuklanan blastokonidyumlarının kopmadan uzaması sonucu gerçek hifler, boğumlar oluşturarak uzaması sonucunda ise yalancı hifler (psödohif) meydana gelir. *C.albicans*, blastokonidyum ve yalancı hif ile birlikte gerçek hif oluşturma özelliğine sahip c kandida türüdür. Diğer kandidalarda da yalancı hiflerin görünümü ve bunlara blastokonidyumların bağlanma şekli tanımlamada yardımcı özelliklerdir (6, 7).

C.albicans hala en yaygın patojen olmasına rağmen, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* ve *C. auris* gibi diğer kandida türleri de günümüzde patojen olarak daha sık gözlenmektedir (8). Bunun nedeni gelişmiş tanımlama yöntemleri, hasta özellikleri, yapılan müdahaleler ve kullanılan ilaçlar ile ilişkili olabilir (9).

2.1.1 Kandidaların üreme koşulları

Kandida türleri basit kültür ortamlarında, aerop koşullarda, 2-8 pH'da 25-37°C'de ve 24-72 saatte ürerler. Genellikle 24 saat içinde kremi veya beyaz, nemli, düzgün veya buruşuk kenarlı, maya kokulu yumuşak koloniler meydana getirirler (3).

2.1.2 Hücre duvarı ve antijenik yapı

Kandida hücreleri; hücre duvarı, sitoplâzmik membran, sitoplâzma, mitokondri, 80S ribozom, endoplazmik retikulum, golgi cisimciğı ve membran ile çevrili bir çekirdekten oluşur (6). Hücre duvarı konak ile ilk temas noktası olması nedeniyle direnç ve virülansta oldukça önemlidir (8). Sert yapısı ile hücreye şekil verir, konak hücrelerine tutunmayı sağlar, konak savunmasına ve osmotik basınç artışına karşı hücreyi korur. Ayrıca duvardaki bazı yapılar immün sistemi uyarıcı özellikteyken, bazıları antifungaller için hedef oluşturmaktadır (3). *C.albicans* ile diğer kandidaların duvar yapısı birbirine benzer olduğu için *C.albicans*'ın hücre duvarına etki eden bir maddenin diğerlerine de etki edebileceğı düşünülür (10). *C.albicans* hücre duvarı 4 ana bileşenden oluşur. Hücre duvarının %80-90'ını karbohidratlar, kalan kısmını proteinler, lipidler, beta-glukanlar ve az miktarda kitin oluşturur. 1,6

β -glukan; suda çözünen bir bileşen olup mannoproteinleri 1,3 β -glukan ve kitin'e bağlayarak duvar yapısının güçlenmesine katkıda bulunur. Ortamdaki şeker miktarının artışı mannoprotein miktarını ve fibriler yapıları artırır. Maya-hif dönüşümü sırasında da duvar kalınlığı ve yapısı değişir. Örneğin: *C.albicans*'ın maya ve hif formlarının duvar yapıları glukan ve mannan içeriği açısından birbirine benzerken hif formundaki kitin miktarı mayadakinden üç kat daha fazladır (3, 10).

Hücre membranı: Hücre membranı hücre içine ve dışına molekül geçişinde önemli rol oynar. Hücre duvar bileşenleri sentezinde ve hücre içi olayların düzenlenmesinde görev alan enzimler de hücre zarında bulunurlar. Hücre membran bileşenleri (örneğin; ergosterol) antifungal ilaçların en önemli hedefidir.

Hücre iskeleti: Hücre iskeleti yapısında yer alan mikrotübüller; sitoplazmik akışkanlığı ve organellerin hareketliliğini düzenler (3).

2.1.3 Kandidalara karşı immün yanıt

Kandidaların insan vücudunda zararsız bir kolonizasyon mu yoksa yaşamı tehdit eden bir enfeksiyon mu oluşturacağını etkileyen başlıca iki faktör söz konusudur;

- 1) Etkili bir bağışıklık yanıtının olup olmaması,
- 2) Mantarın kendi morfolojisini değiştirme kabiliyetinin bulunup bulunmaması.

Kandidaların tek hücreli maya formunun yanında psödohif veya gerçek hif oluşturabilme özelliğinin patojeniteyi kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Tek hücreli maya formu daha çok kolonizasyon ile ilişkili iken psödohif ve hif formları ise genellikle enfeksiyon ile ilişkilidir. Sağlıklı bireylerde mantarın konakta büyümesi zararsız kommensal formula sınırlandırılırken; immün düşüklük durumunda mantar büyümesi kontrol edilemeyebilir ve mantar hifleri mukozal yüzeyleri geçerek enfeksiyona neden olabilir. Hifler aracılığı ile ilerleme damarlara kadar devam ederse mantar tüm vücuda yayılır ve sonuçta doku hasarı meydana gelir. Bu şekilde sistemik enfeksiyon oluşumu özellikle immün düşkün hastalarda hayatı tehdit edicidir.

Dendritik hücreler, kandida türlerine karşı T hücre aracılı immün savunmanın başlatılmasında büyük öneme sahiptir. *C.albicans*'ın dendritik hücreler tarafından tanınması; dendritik hücre yüzeyindeki patern tanıma reseptörleri (PRR) ve fungal hücre duvarındaki patojenle ilişkili moleküler paternler (PAMP) arasındaki etkileşimlerle gerçekleşir. Fungal hücreler dendritik hücreler tarafından tespit edildikten sonra fagosite edilir ve antijenik peptitler asidik veziküllerde işlenir. Bu fungal peptid antijenleri majör doku uyumluluk kompleksinin sınıf II (MHC II) molekülleri üzerinde birleştirilir ve aktive edilmiş dendritik hücrenin yüzeyine taşınır. Mantar antijenleri bellek T lenfositlere sunulur. Hem CD4+T lenfositler (yardımcı T lenfositler) hem de CD8+T lenfositler (sitotoksik T lenfositler) antifungal immünitede önemli rol oynar ve bunların aktivasyonu dendritik hücre popülasyonları tarafından kontrol edilir (11).

Dolaşıma geçen maya hücreleri polimorf nüveli lökositler (PMNL) tarafından öldürülürler. Özellikle *C.albicans*'ın öldürülmesi için miyeloperoksidaz ve hidrojen peroksit kullanılırken diğer kandidalar için oksidatif olmayan mekanizmalar kullanılır. Ek olarak IL-2, TNF-, IL-12 gibi sitokinler de kandidalara karşı savunmada görev alırlar (3).

C.albicans'ın hücre yüzeyinde bulunan moleküller antikor oluşumunu sağlamakla birlikte antikor aracılığı ile bağışık yanıtın hücresel yanıtına nisbetle bu enfeksiyonlarda fazla etkili olmadığı düşünülmektedir (11).

2.2. PATOGENEZ VE VİRÜLANS FAKTÖRLERİ

Virülans faktörleri mikroorganizmaları konak savunmasından korumak için üretilen mikrobiyal ürünlerdir. Mantarlara ait virülans faktörleri 'kolonizasyonu başlatanlar ve ilerletenler' ile 'konağa zarar verenler' olmak üzere iki grupta toplanabilirler. Kolonizasyonu başlatanlar konak ile mantar hücresi arasında sıkı bağlantılar kurarken, zarar verenler ise mantar hücresinin dokuda yayılmasını sağlar ve doku hasarını artırır.

2.2.1 Adezyon

Maya ile konağın ilk karşılaşmasında konak epitel ve endotel hücrelerine adezyon ilk ve en önemli aşamayı oluşturmaktadır. Adezyon özelliği en

yüksek kandida türü *C.albicans*'tır. Maya hücresinin konağa tutunmasında konağın hormonal ve immünolojik durumunun yanında mantarın yüzey özellikleri de önemlidir.

2.2.2 Mantar hücre yüzey hidrofobisitesi

Mantar hücre yüzeyinde hidrokarbonların ve apolar yapıdaki fenilalanin, metionin gibi hidrofobik moleküllerin bulunması konak hücre yüzeyine tutunmayı destekler (12). Mantar hücre yüzey adezinleri: Konak hücrelerine tutunmada görev alan moleküllerdir.

a) Aglutinin benzeri sekans proteinleri: *C.albicans* ailesi, hücre yüzeyi glikoproteinlerini kodlayan 8 gen içerir (ALS1-7 ve ALS-9). Bunlardan sentezlenen proteinlerin en önemli görevleri konak dokusundaki laminin, fibronektin, kollajen, epitel ve endotellere bağlanmayı sağlayarak virülansı arttırmaktır (12, 13).

b) Hifal hücre proteinleri: Maya-hif dönüşümünde, insan yanak epiteline bağlanmada ve biyofilm oluşumunda görev alırlar. *C.albicans*'ta bulunan bu proteine benzer bir protein *C.dublinsiensis*'te de görülmüştür ancak diğer kandidalarda Hwp proteininin olmadığı düşünülmektedir (10, 12).

c) Mannoprotein: Yüksek galaktozlu ortamlardaki fibriller yapının artışı ile birlikte bu glikoprotein miktarında da artış gözlenir. Bu protein insan ağız ve vajen epitellerine tutunup ileri evrede oral ve vajinal kandidiyaza neden olabilir (12).

2.2.3 Maya-hif dönüşümü

Maya hücreleri uygun koşullar altında (37°C sıcaklık, 7.5-8 arası pH) hücre içi siklik adenosin monofosfat (cAMP), siklik guanozin monofosfat (cGMP) ve bazı iyonların miktarının artması sonucu hifal uzama meydana getirirler. Bu oluşum doku invazyonunu kolaylaştırır ve fagositozu güçleştirir, bu nedenle de önemli bir virülans faktörüdür (3, 14).

2.2.4 Fenotipik değişim

Özellikle *C.albicans* kolonileri yuvarlak, bombeli ve beyaz renkli normal maya morfolojisinden; yassı ve opak forma dönüşebilir. Mikroskopik olarak beyaz

hücrelere ait koloniler yuvarlak görünürken opak kolonilere ait hücreler uzamış şekilde görülür. Ayrıca düz yüzeyle maya kolonileri yıldızlı (kenarları çıkıntılı) kolonilere dönüşebilir ve bu durum virülans artışı ile ilgili olabilmektedir (3, 10).

2.2.5 Enzimler

Salgısal Aspartil Proteinaz: Karboksil ya da asit proteinaz olarak da adlandırılabilir. Bu enzim lezyon bölgelerindeki albümin, hemoglobun, keratin, kollajen, müsin ve salgısal immünglobulin A (IgA) gibi birçok proteini parçalayabilir ve fungal adheransa yol açabilir (15, 16).

Fosfolipazlar: Fosfolipaz enzimi membran fosfolipidlerini parçalayarak dokuya invazyonda görev alırlar. Fosfolipaz enzim aktivitesi etken kandidalarda daha yüksek iken, kolonizasyona neden olanlarda daha düşüktür. *C.albicans* kökenlerinin yüksek fosfolipaz aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir (3, 17, 18). *C.albicans* dışı kandidalarda da fosfolipaz aktivitesi görülebilir (3).

Biyofilm: Biyofilm oluşumu mikroorganizmanın yüzeye tutunmak suretiyle başlattığı bir hayatta kalma mekanizmasıdır. Biyofilmin zeminini mayalar, üst kısmını ise hif formları oluşturur. Bunlar glikoprotein ve polisakkarit matriks tarafından çevrelenerek azalmış metabolik aktivite gösterirler. Biyofilm içindeki mantarların virülans özellikleri artar ve antifungal ilaçlara duyarsız veya daha az duyarlı hale gelirler. Kandida türleri protez yüzeylerde, kan ve üriner kateterler üzerinde biyofilm oluşturabilirler. Dokularda glukoz konsantrasyonunun yükselmesi ile serum ve diğer proteinlerin bulunması biyofilm oluşumunu destekler (10, 12).

Özellikle immün düşkün hastalarda biyofilmden kopan planktonik hücrelerin hematogen yayılımı sonucu derin doku enfeksiyonları, kandidemi veya septisemi ortaya çıkabilir. Diş plakları da aslında biyofilm yapıda olup, çürüklerin ve oral kandidiyazın gelişiminden sorumludurlar (12).

2.3. KANDİDA ENFEKSİYONLARI

Tıbbi açıdan önemli fungal enfeksiyonlar iki grupta sınıflandırılabilir (11). İlk grup; deri, mukoza gibi yüzeylerin mikozlarıdır. Toplumda oldukça yaygın olan

yüzeyel mikozlar hafif seyirli enfeksiyonlara yol açar ancak immün düşkün kişilerde enfeksiyon şiddeti daha fazla olabilir. İkinci ana grup ise steril vücut bölgelerini içeren invazif mantar enfeksiyonlarıdır (19).

2.3.1 Yüzeyel Kandida Enfeksiyonları

Oral kandidiyaz: Oral kandidiyaz insanda oral kavitenin en yaygın mikotik enfeksiyonudur (20). *C.albicans* ve daha nadir olarak diğer kandidalar toplumun yaklaşık %75'inin oral kavitesinde kolonize olurlar ve immün sistemi sağlam kişilerde genellikle iyi huylu olarak kalırlar (1). İmmün sistemin baskılanması durumunda ise dudaklar, damak, dil, dişeti ve yanak mukozası dahil ağız içi her yerde enfeksiyona yol açabilirler. Oral kandidiyaz vakalarının büyük çoğunluğu yaşamı tehdit edici değildir ancak hematogen yayılım sonucunda fulminan enfeksiyonlar meydana getirebilirler. Bu nedenle risk altındaki tüm hastalarda oral kandidal enfeksiyonlar etkili bir şekilde tedavi edilmelidir (20). Oral kandidiyaz'da en sık etken *C.albicans*'tır. Sıklık sırasına göre etken olabilecek diğer kandidalar ise *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.krusei* ve *C.dublinensis*'dir (3).

Kandida özefajiti: Derin kandidiyaz grubunda değerlendirilebileceği gibi orofaringeal kandidiyaz ile birlikte ya da tek başına değerlendirilebilir. Sıklıkla immün düşkün hastalarda görülür. Etken kandidaların görülme sıklığı oral kandidiyazdaki gibidir (3).

Kandida vulvovajiniti ve balanit (Penil kandidiyaz): Kadınların % 75'i hayatları boyunca en az bir defa kandida vulvovajiniti geçirirler. Etken olarak en sık *C.albicans* görülür. *C.glabrata* ise ikinci sırada yer alır. Enfeksiyon gelişimi için hazırlayıcı faktörlerden bazıları diyabet, gebelik ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımudur. Balanit de en sık diyabet ile ilişkili olarak ortaya çıkar ve eşler arası geçiş söz konusu olabilir (3).

Primer kutanöz kandidiyazlar: İntertrigo; ısı, nem, maserasyon, sürtünme ve havasızlık ile indüklenen veya şiddetlenen deri kıvrımları enfeksiyonudur. Sıklıkla aksilla, perine, meme altı kırışıklıkları ve abdominal katlantıları etkiler. Obezite, diabetes mellitus, immün düşkünlük durumu hem hastalığın ortaya çıkışını hem de nüksünü kolaylaştırır (21).

Onikomikoz ve paronişi: Onikomikoz; dermatofitler, dermatofit dışı mantarlar ve mayaların etken olduğu tırnak enfeksiyonları olup klinikte karşılaşılan en yaygın tırnak hastalığıdır (22). Paronişi en sık el ve ayak baş parmağında görülür (3). *C.albicans* ve *C.parapsilosis* en sık görülen etkenlerdendir (23).

Kronik mukokutanöz kandidiyaz: Endokrinopatiler, otoimmün hastalıklar ve hücrel immün sistemdeki değişikliklere bağlı olarak, genelde *C.albicans* tarafından oluşturulan kalıcı ve tekrarlayan enfeksiyonlardır. Nadiren dissemine veya invazif kandidiyaza ilerleyebilir (24).

2.3.2 İnvazif Kandida Enfeksiyonları

Kandidemi ve invazif kandidiyazis: Kandida türleri sepsis etkenleri arasında ilk sıralarda yer alır. İnvazif kandidiyazis veya kandidemisi olan hastalarda ölüm oranları oldukça yüksektir (%40 - %60). Tedavinin gecikmesi mortaliteyi daha da arttıracığı için etkenin erken tanımlanması ve uygun antifungal tedavinin en kısa sürede başlanması kritik öneme sahiptir. İnvazif enfeksiyonlarda en sık görülen kandida türleri; *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* ve *C.krusei*'dir (25). *C.albicans* dışı kandidalar bazı merkezlerde tüm vakaların % 50'sinden sorumlu olup doğal direnç (*C. krusei*) ile veya azoller (*C. glabrata*) ve ekinokandinler (*C.parapsilosis*) için azalmış duyarlılık ile ilişkilidirler. İnvazif kandidemi ve kandidiyazis etyolojisinde antifungal ajanların yaygın kullanımının (özellikle azoller) büyük etkisi vardır (4).

Gastrointestinal kandidiyaz: Sağlıklı bireylerde gastrointestinal sistem, oral ve vajinal kavitede *C.albicans* kommensal olarak bulunur. Bu nedenle immün sistemi baskılanmış hastaların gastrointestinal kanalında oluşan yaralar önemli bir giriş kapısı olup kandidiyaz gelişiminde rol oynayabilir (26).

Pulmoner kandidiyaz: Sistemik kandidiyazla aynı anda ortaya çıkabilen pulmoner kandidiyaz sıklıkla dissemine enfeksiyonların bir sonucudur ve nadiren görülmektedir. Tanısı kapalı veya açık biyopsi ile akciğer dokusundaki kandidal apsenin histopatolojik olarak görülmesi ile konulur (27).

Kandida endokarditi: Kandidalara bağlı enfektif endokarditler tüm enfektif endokarditlerin yaklaşık %1-2'sini oluşturur ancak mortalite oranları %30-80 arasında seyrettiği için bu oran oldukça önemlidir. Son yıllarda fungemi görülme sıklığındaki artış da bu oranların değişmesine yol açabilir (28).

Merkezi sinir sistemi enfeksiyonları: Kandidalar nadiren de olsa menenjit, beyin absesi ve ensefalit gibi tablolara yol açabilirler. Özellikle antibiyotiğe yanıt vermeyen menenjitlerde ve nörolojik bulgularla seyreden yaygın kandidiyazlılarda kandida kaynaklı merkezi sinir sistemi enfeksiyonu akla gelmelidir. Beyin abseleri büyük boyutta ise fokal nörolojik belirtiler verirken, mikroabseler nörolojik bozukluklara yol açmayabilir (3).

Üriner sistem enfeksiyonları: Kandidalar asendan veya hematojen yol ile üriner sisteme ulaşarak sistit ve piyelonefrit yapabilirler. Semptomları diğer patojenlerin neden olduğu üriner enfeksiyonlardan çok farklı değildir. İdrarda maya benzeri organizmalar tesbit edildiğinde verilecek en önemli karar; bu durumun enfeksiyon mu, kolonizasyon mu yoksa kontaminasyon mu olduğudur. Değerlendirmede ilk adım idrar tahlili ve idrar kültürünü tekrarlayarak maya üremesini doğrulamaktır. Kültürde koloni sayımının tanısal açıdan yararlı olduğu kanıtlanamamıştır (29).

2.4. KANDİDA ENFEKSİYONLARINDA TANI YÖNTEMLERİ

Kandida enfeksiyonlarının tanısında kan, beyin omurilik sıvısı, bronkoalveolar lavaj, trakeal aspirat, aspirasyon sıvısı, doku biyopsileri, idrar, yüzeysel lezyonlardan kazıntı ve sürüntüler ile intravenöz kateter örnekleri gibi klinik örnekler kullanılabilir (6).

Mantar enfeksiyonlarının tanısı; direkt mikroskopik bakı, floresan boyama, mantar kültürü, radyolojik özellikler ve kültür dışı tetkikler ile konulmaktadır (29). Mikroskopik inceleme ve kültür gibi klasik yöntemler esas tanı yöntemleri olarak bilinirken diğer yöntemler tanıya yardımcı olarak kullanılmaktadır (6). Kültür dışı yöntemler; serolojik yöntemlerle antijen veya antikör tesbiti, metabolitlerin tayini, moleküler metotlar ve Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyonu - Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS) gibi diğer yöntemleri içermektedir (29).

2.4.1 Klinik Örnekten Direkt Mikroskopik Bakı

Tanı için örnekten yapılacak ilk işlemdir. Mikroskopik yöntemler %10'luk Potasyum Hidroksit (KOH) ile muamele edilmiş veya kalkoflor beyazı, giemza, periyodik asit shift (PAS) gibi boyama yöntemleri ile boyanmış örneklerin incelenmesini içerir. KOH mantar hücrelerine zarar vermeden doku artıklarını temizleyerek klinik örnekteki mayaların (tomurcuklanan maya hücresi ve psödohiflerin) varlığının saptanmasını kolaylaştırır. Psödohiflerin görülmesi kolonizasyona ve doku invazyonuna işaret edeceği için önemlidir ancak bu yöntemin duyarlılığı düşük olduğundan mantar hücrelerinin görülmesi için enfeksiyonun ilerlemiş dönemde olması ve mantar hücrelerinin fazla miktarda bulunması gerekir. Örnekten direkt mikroskopik bakı ile tür tanımı mümkün değildir. Bu nedenle erken tanı yöntemi olarak kabul edilmez ancak bazı durumlarda enfeksiyonu tesbit edebilen tek yöntem olabilir.

2.4.2 Kültür

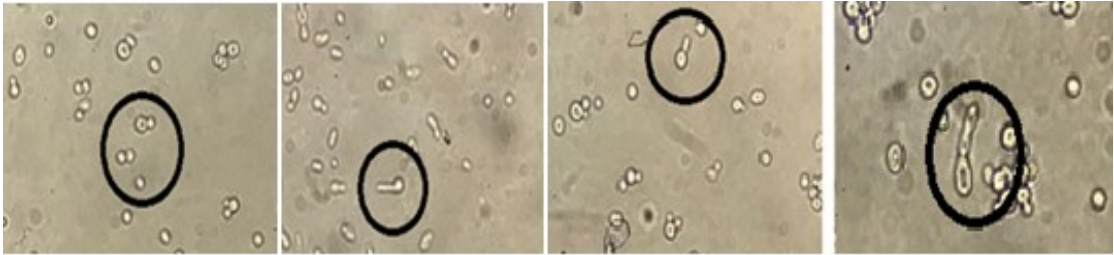
Mantar enfeksiyonlarının tanısında en duyarlı ve altın standart yöntemdir. Mantarı üretebilmenin yanında tanımlama ve gerekirse antifungal duyarlılık testlerinin yapılmasını mümkün kılar (6). Mantarlar için yaygın olarak kullanılan kültür besiyerleri kanlı agar, sikloheksimid içeren veya içermeyen sabouraud dekstroz agar (SDA), malt ekstrakte agar, mısır unu agar ve beyin kalp infüzyon agarı içerir. Sikloheksimid, kloramfenikol ve gentamisin gibi antibiyotik içeren besiyerleri polimikrobiyal enfeksiyon veya bakteriyel floranın görülebileceği numuneler için tercih edilir. Örnekler uygun besiyerine ekildikten sonra 25°C ve 37°C'de inkübe edilir. Üreme 24 saate kadar başlamış olsa da kolonilerin gözle görünür hale gelmesi genellikle 48-72 saati bulmaktadır (29). Kandida türleri genelde düzgün yüzeyli, bazen yıldızsı şekilde çıkıntıları olan, hafif kubbeli, kremi beyaz renkli, 1-2 mm çapında, tereyağı kıvamında, maya kokulu koloniler meydana getirirler. *C.krusei* ise düz, kuru bir koloni morfolojisi sergiler 2.1 (30, 31).

Kültürde üreme sonrası ilk yapılabilecek işlem germ tüp (çimlenme borusu) testidir. Bunun için maya kolonileri serum içerisine alınarak etüvde yaklaşık 2 saat bekletildikten sonra 40X büyütmede incelenir. Blastokonidyumlar oval ya da yuvarlak, tomurcuklanan hücreler şeklinde görülürken (Şekil 2.1),



Şekil 2.1: SDA besiyerinde *Candida krusei* (a) ve *Candida albicans*'ın (b) koloni görünümü

germ tüp; maya hücresinden çıkan, ana hücrenin 3-4 katı uzunlukta ve hücreden çıkış noktasında boğumlanma oluşturmeyen bir yapıdır. *C.albicans* ve *C.dublinensis* germ tüp (çimlenme borusu) oluştururken (Şekil 2.2), *C.tropicalis* germ tüp benzeri bir yapı oluşturur ancak bu uzantı hücreden çıkış noktasında belirgin boğumlanma oluşturması ile diğerlerinden ayrılır (Şekil 2.2) (6).



Şekil 2.2: Direkt mikroskopik bakı ile kandidalarda blastokonidyum (a), germ tüp (b), yalancı hif (c ve d) görünümü

Daha ileri tanımlama için mısır unu-tween 80 agar gibi besinden fakir ortamlarda lam kültürü yöntemi ile kandida türlerinin morfolojik özellikleri incelenir. Bu yöntemle mayaların oluşturdukları gerçek ve yalancı hifler, blastokonidyalar ve klamidosporların yapı ve yerleşimlerine göre tür düzeyinde tanımlama yapılabilir (6, 7).

2.4.3 Kültür Dışı Tanı Yöntemleri

Geleneksel yöntemlerin kısıtlılıkları nedeniyle uzun zamandır invazif mantar enfeksiyonların tanısı için hücre bileşenlerinin tanımlanmasına dayanan kültüre alternatif yöntemler araştırılmaktaydı. Son yıllarda da bu anlamda önemli gelişmeler meydana gelmiştir (29).

2.4.3.1 Serolojik Tanı

Serumda antikor veya antijen tesbiti ile yapılır. Antikor tesbiti mantar enfeksiyonlarında prognoz ve tedavi takibi için fayda sağlar. Ancak yüksek çapraz reaksiyonlar nedeniyle duyarlılık ve özgüllükleri düşüktür. Saprofitik yada kommensal bir mantarın varlığına bağlı olarak enfeksiyon olmasa dahi antikorlar tesbit edilebilir. Bu yüzden antijen tesbiti daha iyi bir alternatiftir. İnvazif mantar enfeksiyonlarının tanısında kullanılacak ideal bir antijen; geçici kolonizasyonla ilişkili olmamalı, enfeksiyon ile bağlantılı olmalı ve diğer antijenlerle çapraz reaksiyona girmemelidir.

Galaktomannan tayini: İnvazif aspergilloz tanısında spesifik kabul edilmekle birlikte antifungal profilaksinin duyarlılığı azalttığı gösterilmiştir. Diğer mantar türleri ile çapraz reaksiyonlar, β -laktam antibiyotiklerin veya immün süpresif ilaçların kullanımı sonucunda yanlış pozitiflikler görülebilir.

1,3- β -D-glukan tayini: Birçok mantar türünün hücre duvarı bileşeni olan 1,3- β -D-glukan invazif mantar enfeksiyonları sırasında kanda tespit edilebilir. Bu test klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik bulgularla birlikte kullanılabilir. Ancak mükemmel duyarlılığının yanında düşük özgüllüğü nedeniyle negatif çıkması mantar enfeksiyonunu dışlamaz.

Mannan: Kandida hücre duvarının önemli bir bileşeni olup güçlü antikor yanıtı oluşturur. Bu nedenle mannan antijeni ile antimannan antikorlarının birlikte tesbiti kandidemi tanısında faydalı olabilir. Bu testlerin tek başına duyarlılığı %50'den düşükken, birlikte kullanıldıklarında duyarlılık %89'lara kadar yükselmektedir.

Enolaz: Tüm kandida türleri tarafından üretilmektedir ancak düşük duyarlılığa sahiptir ve piyasada bulunmamaktadır.

Salgılanabilir aspartil proteinaz: Salgılanabilir aspartil proteinazların hücre dışı salınımı sonucunda aktif doku invazyonu indüklenebilir ve bu enzimin hücre dışı konsantrasyonunun artışı basit enfeksiyondan çok invazif hastalık ile ilişkilidir. Monoklonal antikorlar kullanılarak Enzim Bağlı İmmüno-sorbent Deneyi (ELİSA) ile tesbit edilebilmektedir. Özgüllük ve duyarlılık sırasıyla %96 ve %93'tür (29).

2.4.3.2 Metabolitlerin tayini

Hastaların vücut sıvılarında mantara ait metabolik ürünlerin tesbitine dayanır ve tanıda kullanılabilir. Örneğin; D-Arabinitol üretimi, serum ve/veya idrarda gaz kromatografisi ile ya da enzimatik ve spektrofotometrik olarak tespit edilebilir. D-Arabinitol gibi metabolitler *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* tarafından üretilirken *C. glabrata*, *C. krusei* ve *C. neoformans* tarafından üretilmez.

2.4.3.3 Nükleik asit tayini

Klinik örneklerde fungal nükleik asitin tespit edilmesi için küçük miktarlardaki deoksiribonükleik asit (DNA)'in moleküler yöntemlerle çoğaltılması sağlanabilir. Moleküler tanı daha çok etkenin kesin olarak belirlenmesi için veya kapsamlı araştırma gerektiren durumlarda ve referans laboratuvarlar aracılığı ile yapılır. Bu yöntemin kültür ve serolojik yöntemlerden daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması, hızlı sonuçlanması, ampirik antifungal kullanımını azaltması önemli avantajlarından. Ancak moleküler tanı kolonizasyon ile aktif enfeksiyon ayırımı yapamadığı için yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir. Mantarların tesbiti için kullanılan en son tekniklerden bazılarına; floresan in situ hibridizasyon (FISH), multipleks tandem PCR (MT-PCR), gerçek zamanlı PCR (qPCR), rastgele arttırılmış polimorfik DNA (RAPD) ve ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) örnek olarak verilebilir.

2.4.3.4 MALDI-TOF MS:

MALDI-TOF MS tüm dünyada klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılabilen nobel ödüllü bir cihazdır. Yapılan çalışmalar daha çok bakteriler ile yapılmış olsa da klinik önemi olan mantarların hızlı ve güvenilir

şekilde tanımlanması için bu yöntemin kullanımına dair yayınlar artmaktadır ve cihazın gelişimi devam etmektedir (29).

2.5. KANDİDA ENFEKSİYONLARINDA KULLANILAN İLAÇLAR

Kandida türü mantarların tedavisinde kullanılan antifungal ilaç grubunda; azoller, ekinokandinler, poliyenler ve nükleozit analogları gibi sınırlı sayıda kimyasal bileşen yer almaktadır (32). Antifungal ilaçların başlıca hedefi hücre duvarı ve hücre membranıdır. Mantar hücre membranında bulunan ergosterol birçok antifungal maddenin seçici toksisitesinin temelini oluşturur (33).

2.5.1 Azoller

Azoller (flukonazol (FLZ), itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, isavuconazol) kandida enfeksiyonlarını tedavi etmek için yaygın kullanılan bir ilaç grubudur ve nötropenik olmayan hastalarda kandidemi tedavisinde birinci seçenek olarak önerilmektedirler. Genellikle fungistatiktirler ve 14- α -sterol-demetilaz enzimini inhibe ederek mantar hücresinde ergosterol biyosentezini engellerler. Bu da mantar hücresinin ölümüne neden olur (32, 34). Kandida türlerinin azollere sürekli maruziyeti azol dirençli kökenlerin ortaya çıkmasına neden olur. Direnç gelişimi genellikle dışa atım pompalarını oluşturan direnç genlerinin artan ifadesine bağlı olmakla birlikte birden fazla mekanizmaya bağlı olabilir. Özellikle FLZ dirençli kandidalar diğer azollere duyarlı kalabilirler. Örneğin; *C.krusei* flukonazole karşı doğal dirençli iken vorikonazole duyarlıdır (35).

2.5.2 Ekinokandinler

Ekinokandin türevi ilaçlar (kaspofungin, mikafungin ve anidulafungin) mantar hücre duvarlarının temel bileşeni olan β -1,3-D-glukanın sentezini inhibe eden lipopeptid yapıdaki moleküllerdir. β -1,3-D-glukan insanlarda bulunmadığı için böbrek ve karaciğer üzerindeki terapötik etkileri düşüktür. Ekinokandinlerin oral biyoyararlanımı düşük olduğu için intravenöz olarak uygulanırlar. Ekinokandinler *C.glabrata* ve *C.krusei* gibi azol direnci bulunan mayalara ve biyofilmlere karşı oldukça etkilidirler ancak %2-3 gibi düşük oranlarda olsa dahi bunlara karşı da direnç gözlenebilir. Söz konusu direnç;

glukan sentaz kompleks enzimini kodlayan FKS genlerindeki mutasyonlara bağlıdır (32, 36).

2.5.3 Poliyenler

Toprakta bulunan ve aerobik bir aktinomiset olan *Streptomyces* türünden izole edilen biyolojik aktif metabolitlerdir. Yüzden fazla poliyen tanımlanmış olsa da amfoterisin B ve nistatin insanlarda mantar ve protozoal enfeksiyonları tedavi etmek için en yaygın kullanılan iki ajandır (36). Poliyenler plazma membranında ergosterole bağlanıp gözenek oluşturarak etki gösterirler (32). Plazma-membran geçirgenliğinin iyonlara ve küçük moleküllere karşı artmasından kaynaklanan hücrel elektrokimyasal gradyanların bozulması, sonuç olarak hücre lizisine ve ölümüne yol açar.

2.5.3.1 Amfoterisin B

Son 50 yılda diğer antifungallere kıyasla daha geniş spektrumlu etkiye sahip olduğu için kritik hastaların tedavisinde en yaygın kullanılan antifungal ajandır. Ancak nefrotoksisite ve ototoksisite gibi bazı yan etkiler kullanımlarını sınırlandırmıştır. Bu yan etkileri azaltmak için çeşitli lipozomal formülasyonları geliştirilmiştir.

2.5.3.2 Nistatin

Amfoterisin B'nin aksine nistatin kullanımı sadece yüzeysel kandida enfeksiyonlarının topikal tedavisi ile sınırlıdır. Çünkü oral olarak verildiğinde etki göstermez ve intravenöz uygulandığında da ciddi ölçüde toksiktir. Son zamanlarda bunlar için de toksisiteyi önemli ölçüde azaltan lipozomal formülasyonlar geliştirilmiştir (36).

2.5.4 Nükleozit analogları

Flusitozin; pirimidin metabolizmasını ve DNA sentezini bloke ederek antifungal etki gösterir (32).

2.6. FENOLİK BİLEŞİKLER

Fenolik bileşikler (polifenoller) bitki ve meyvelerde en bol bulunan ikincil metabolitler olup çeşitli fizyolojik görevlere sahiptirler. Bitkilerde birbirinden

farklı renk, tat ve koku oluşturmanın yanı sıra dışarıdan gelecek zararlara karşı korunmayı da sağlarlar (37). Kimyasal yapıları 1941 yılında kağıt kromatografisinin geliştirilmesi ile anlaşılmaya başlanmış olan fenolik bileşiklerin tam olarak karakterizasyonları ise UV-görünür spektrofotometre, kütle spektrometresi (MS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) kombinasyonu kullanılarak açığa çıkarılmıştır (38). Yapılarında en az bir aromatik benzen halkası ile buna bağlı hidroksil (OH) grubu bulundurulur. Halka sayısına ve yan zincirlerine göre tanenler, ligninler, kumarinler, tokoferoller, flavanoidler ve fenolik asitler gibi çeşitli gruplara ayrılırlar (39-41). Fenolik asitler ise hidroksibenzoik asitler (elajik asit, gallik asit, salisilik asit vb.) ve hidroksisinamik asitler (kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit vb.) olmak üzere iki gruba ayrılırlar (42). Doğada ester, amid veya glikozit türevleri şeklinde bulunurlar. Etkilerini genelde hidrofilik ortamda gösterirler (40, 42). Günümüzde fenolik asitlerin elde edilmesi ve miktar tayini amacıyla daha çok çeşitli ekstraksiyon yöntemleri veya yüksek performanslı likit kromatografisi (HPLC) kullanılmaktadır (43).

Bazı fenolik bileşikler (örneğin: vanilin, öjenol, vinilfenol) uçucu ve koku verici yapıda bulunurken, bazıları ağızda tat reseptörleri ile etkileşerek acımsı tat hissine neden olurlar. Bazıları ise (örneğin: tanenler) tükürük proteinleri veya yanak epiteli ile etkileşerek büzülme hissi oluştururlar. Renk verme özellikleri buldukları ortam pH'ına bağlı olarak değişmektedir (44).

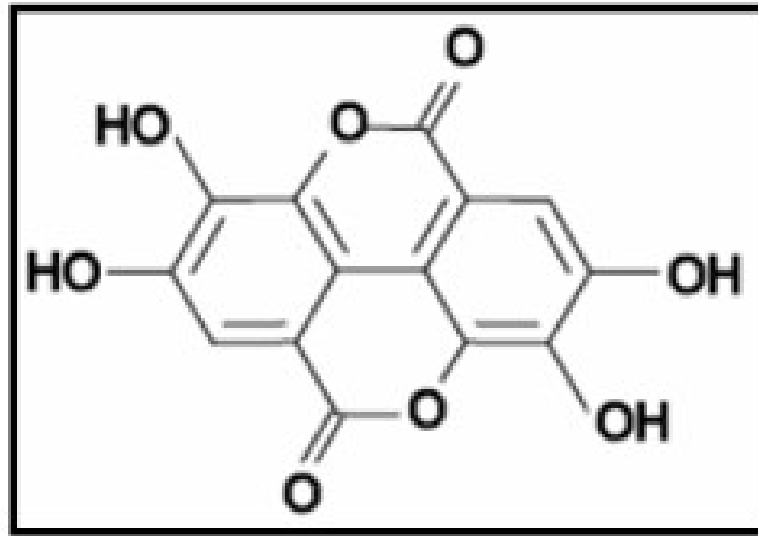
Günlük diyetimizin önemli bir kısmında yer alan fenolik bileşikler gıdaların korunmasında kimyasallara karşı doğal bir alternatif olmanın yanı sıra insan sağlığı üzerinde de koruyucu etkiye sahiptirler. Sağlık üzerindeki etkileri reaktif oksijen türevlerinin (ROS) azaltılması, geçiş metali iyonlarının şelatlanması ve oksidatif strese neden olan enzimlerin inhibisyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmaların aracılık ettiği antioksidan aktivitelerine atfedilir (44). Antioksidan, antialerjik, antikanserojen, antiinflamatuvar özelliklerinin yanında antimikrobik ve antibiyofilm aktiviteleri de söz konusudur (39).

Fenolik bileşikler mikroorganizmalar üzerinde değişik düzeyde etki gösterirler. Bu farklılık aromatik halkaya bağlı olan yan zincirlerin sayısına, konumuna ve bileşiğin bitkiden eldesi sırasında kullanılan yöntem ve çözücüye bağlı

olabilir (40). Yan zincir uzunluğunun artması ile antimikrobiyal etki genellikle artar (45). Bakterilerde ve mantarlarda membran geçirgenliğinde artış, duvar yapımında bozulma, çeşitli enzimlerde inhibisyon ve genetik yapılarda hasar meydana getirerek öldürücü etki gösterirler (40, 41, 45). Bazı fenolik bileşiklerin ise apoptoz özelliği ile antifungal etki gösterdiği ve diğer antifungallerle sinerjik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (örneğin: kurkumin, ögenol, baikalein vb.). Timol, karvakrol ve baikalein de dışa atım pompalarını bloke etmek yolu ile antifungal duyarlılığı arttırabilirler (37).

2.6.1 Elajik asit

Bitki bazlı antioksidanların insan sağlığına önemi belirginleştikçe bu bileşiklerin zengin kaynakları ve etkileri üzerine çalışmalar artmaktadır. Fitokimyasallar olarak da bilinen polifenolik bileşiklerden dikkatleri en çok çeken elajik asit (EA) olmuştur. Elajik asit (2,3,7,8-Tetrahydroxy[1]benzopyrano[5,4,3-cde][1]benzopyran-5,10-dione); bitkilerde, sebze ve meyvelerde (ahududu, çilek, üzüm, nar, siyah kuş üzümü, mango, ceviz, badem ve yeşil çay) bulunurlar 2.3. İnsan sağlığı üzerinde antioksidan, antiapoptotik, antikanserojen, antimetastatik ve antiinflamatuvar özelliklerinin yanında nöroprotektif etkileri ile pek çok fayda sağladıkları bildirilmiştir (46, 47). Bitkilerde askorbik asit (C vitamini) varlığının EA'in fenolik yapısını koruduğu ve antioksidan özelliğine katkı sağladığı düşünülmektedir (48).



Şekil 2.3: Elajik asitin ($C_{14}H_6O_8$) kimyasal yapısı

Yapılan araştırmalarda EA'in pankreas yıldız hücrelerinde reaktif oksijen türevlerini (hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil anyonları) inhibe ederek kronik pankreatite karşı koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (49). Antitümöral etki ise genellikle antioksidan, antiproliferatif ve apopitotik özelliklerine bağlı olarak ortaya çıkar. Ayrıca tümör hücre migrasyonu, invazyonu ve anjiogenez inhibisyonu ile metastatik süreci engelleyebilir (46, 50). Ek olarak EA uygulaması sonucu tümörün geleneksel tedaviye (kemoterapi, radyoterapi) duyarlılığının arttığı da düşünölmektedir (46).

Elajik asit alzheimer ve parkinson gibi hastalıklar için de umut verici bir bileşiktir. Öğrenme ve bellek üzerindeki olumlu etkileri ile alzheimer hastalığının, antioksidan etkisi ile de parkinson hastalığının etkilerini azaltabileceği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (47).

Elajik asitin gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı inhibitör etkili olduğu düşünölmektedir. Yapılan çalışmalarda elde edilen MİK değerleri *Listeria* ve *Clostridium* cinsi bakteriler için 5 ppm altında, *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* için 10 ppm altında, *Escherichia coli* için 20 ppm ve *Salmonella* türleri için 10-20 ppm olarak saptanmıştır (39). Oldukça dirençli bir bakteri olan *Acinetobacter baumannii*'yi 250 µg/ml'de %67'ye kadar inhibe ettiği ve ayrıca *Acinetobacter baumannii*'ye karşı sentetik antibiyotiklerin (novobiyosin, rifampisin, fusidik asit gibi) etkisini arttırdığı görölmüştür (51). Toplumda yaygın şekilde görölen ve gastrik karsinoma kadar ilerleyebilen *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarına da oldukça etkili olduğu düşünölmektedir. Yapılan bir çalışmada EA muamelesi sonrası *Helicobacter pylori* hücrelerinin basil şeklinden kültürlenemeyen kok haline döndüğu ve flagellar yapıların bozulması ile hareket özelliğini kaybettiği görölmüştür. Ayrıca in vivo olarak da gastrik mukoza lezyonlarının EA etkisi altında neredeyse normale döndüğu belirtilmiştir (52). Gram pozitiflerden hastane kaynaklı enfeksiyonlarda gittikçe daha sık karşılaşılan Beta-laktam direnci nedeniyle alternatif tedavi yollarının arandığı metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA) kökenlerinde yaklaşık 125 µg/ml'de etkili bulunmuştur (53). Dolayısıyla elde edilen sonuçlara bakılarak EA'in başta *H.pylori* olmak üzere gram negatif ve diğer gram pozitif bakterilere karşı hem önleyici hem de tedavi edici özelliğe sahip olduğu düşünölebilir (52, 54, 55).

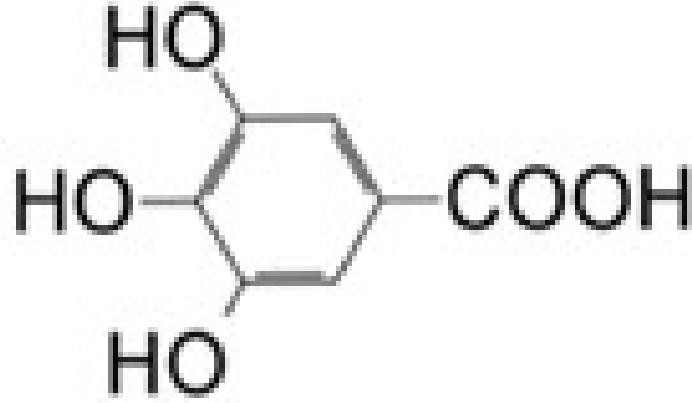
Elajik asitin Hepatit B, Hepatit C ve İnfluenza virüs A gibi virüsler üzerinde çeşitli enzim ve proteinlerin inhibisyonu sonucu antiviral etki gösterebildiği bildirilmekle birlikte virüsler üzerindeki çalışmalar devam etmektedir (50, 56, 57). *Plasmodium falciparum* gibi parazitlere de in vitro etkili bulunmuş ve antimalaryal ilaçların (klorokin, meflokin, artemisinin ve atovakin gibi...) etkisini arttırdığı bildirilmiştir (40, 58). Mantar hücrelerinde ise squalen epoksidaz ve sterol 14- α -demetilaz (CYP51) gibi enzimlerin inhibisyonu sonucu ergosterol sentezini ve duvar oluşumunu bozarak antifungal etki gösterir. Özellikle dermatofitler üzerinde yüksek antifungal etkisi tespit edilen EA'in, topik uygulama ile kobayda oluşturulan *Trichophyton rubrum* enfeksiyon modelinde iyileşmeyi önemli ölçüde hızlandırdığı saptanmıştır. Bu da EA'in doğal bir antifungal olarak da kullanılabileceğini düşündürmektedir (59).

2.6.2 Gallik asit

Polifenol bileşiklerden taninler arasında yer alan gallik asit (GA) (3,4,5 trihidroksibenzoik asit) kristal halde, katı, renksiz veya hafif sarı bir maddedir (Şekil 2.4). İyi bilinen doğal bir antioksidandır ve toksik etkisi bulunmamaktadır (60). Su, alkol, eter ve gliserolde erir (61). Özellikle çay ve üzüm gibi çeşitli meyvelerde bol miktarda bulunur (62). Gıdaların paketlenmesinde yenilebilir kaynaklardan elde edilmesi ve yüksek O₂ tutucu yapısı ile potansiyel bir koruyucudur (60).

Gallik asit antioksidan özelliği ile insan hücrelerinin oksidatif hasara karşı korunmasına yardımcı olur ve sağlıklı hücrelere zarar vermeden, kanser hücrelerine karşı sitotoksikite gösterir. İç kanama durumlarında damar büzücü olarak kullanılır. Ayrıca albüminüri ve diyabeti tedavi etmek için de kullanılabilir (37).

Yüksek yağ diyetine tabi tutulan farelerde trigliserit ve LDL kolesterol seviyesinde azalma, HDL kolesterol seviyesinde artış sağlayarak antihiperlipidemik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (63). Ayrıca travmatik beyin hasarı sonrası beyin lipid peroksidasyonu ve serebral proinflatuar sitokinlerin azalmasına bağlı olarak gerçekleşen kalıcı öğrenme ve hafıza bozukluklarına karşı nöroprotektif etkiye sahiptir (64). Çeşitli



Şekil 2.4: Gallik asitin ($C_7H_6O_5$) kimyasal yapısı

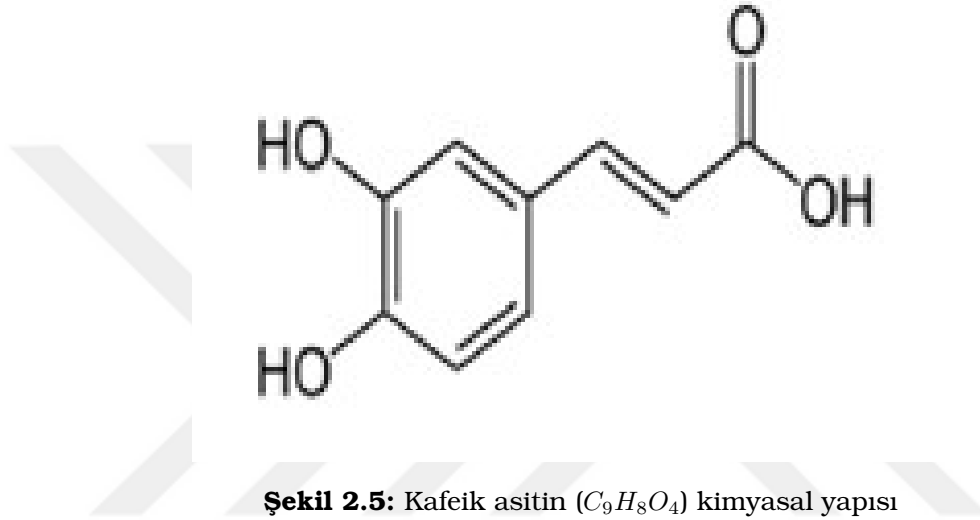
kardiyovasküler hastalıklara karşı olumlu etkilere sahip olup kalp hipertrofisi ve kalp yetmezliği tedavisinde de umut verici bir adaydır (63).

Gallik asitin ayrıca antimikrobiyal, antifungal ve anti inflamatuvar özellikleri bulunmaktadır (61). Özellikle yan zincirinde daha fazla C atomu içeren ester türevleri daha yüksek antifungal, antiviral, antioksidan etkiye sahiptir (42). Antibakteriyel özelliğini hücre zarında hidrofobisiteyi değiştirmesi sonucu sitoplazmik içeriğin dışarıya boşalması yolu ile gösterir (40). *S.epidermidis*, *S.aureus* ve *K.pneumoniae*'ye karşı etkili bulunmuştur (65). Ayrıca antimikrobiyal bir madde olan trimetoprim sentezi için de kullanılmaktadır (66). Mantar hücrelerinde ise EA ile benzer şekilde enzim inhibisyonu yaparak duvar oluşumunu engeller ve mantar hücresinin ölümüne yol açar (64). Ayrıca İnfluenza virus'a karşı da antiviral etkisi gösterilmiştir (56).

2.6.3 Kafeik asit

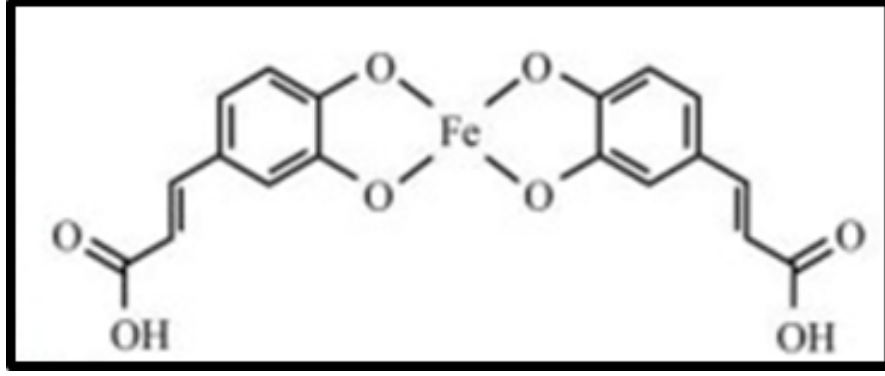
Kafeinden farklı bir bileşik olan kafeik asit (KA) (3-(3,4-Dihydroxyphenyl)prop-2-enoic acid) bitkilerde yaygın bulunan fenolik bir bileşiktir (67) 2.5. En fazla kahvede bulunur. Bunu dışında kekik, adaçayı, nane, anason, tarçın gibi bitkilerde; elma, kayısı, erik gibi meyvelerde bulunmaktadır (68). Ortalama bir fincan kahvede 96 ile 1236 mg arasında değişen oranlarda KA bulunur ve insan vücudundaki emiliminin yaklaşık %95 ince bağırsaklarda gerçekleşir (69). KA otoksidasyona duyarlı

bir bileşiktir. Glutasyon, tiyol bileşikleri (sistein, tiyoglikolik asit veya tiyokresol) veya askorbik asit KA üzerinde koruyucu bir etkiye sahiptir (70). KA güçlü antioksidan olması ile birlikte doku hasarını azaltıcı (doku koruyucu), immünomodülatör, anti-inflamatuvar ve antimikrobik özelliklere sahiptir (67). Anti-alzheimer, anti-diyabetik, hipokolesterolemik etkilerinin bulunduğu da gösterilmiştir. Hipertansiyonda rol oynayan çeşitli enzimlerin aktivitesini azaltarak antihipertansif ve kardiyoprotektif etki gösterir (71). Kollajen üretimini artırarak erken yaşlanmayı önlediği de bildirilmiştir (43).



KA bazı bakterilere karşı etkisiz olmakla birlikte düşük pH'da çeşitli mikroorganizmalara (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*) karşı etkili olduğu bildirilmiştir (45, 67). Mantarlardaki öldürücü etki hücre zarı hidrofobisite değişikliği sonucu hücre içeriğinin dışarıya sızması yolu ile ortaya çıkabileceği gibi, çeşitli enzimlerin (1,3- β -glukan sentaz, izositrat liyaz gibi...) ve virülans faktörlerinin inhibisyonu yolu ile de gözlenebilir (61). Ayrıca bazı antifungal ilaçlarla sinerjik etki gösterebilir (67).

Çeşitli çalışmalarda KA içeren organik bileşiklerin HSV, influenza A ve HIV'e karşı anti-viral özelliklere sahip olduğu bulunmuştur. KA'in revers transkriptaz enzimini inhibe ettiği, integraz enziminin ise zayıf inhibitörü olduğu bilinmektedir. Kafeik asit fenil esterleri ise integraz enzimini daha güçlü şekilde inhibe edebilirler (72, 73).



Şekil 2.6: Kafeik asit- demir (III) şelat yapısı

KA tek başına kararsız yapıya sahiptir ancak çeşitli bileşikler ile bağlandığında daha kararlı ve etkili bir yapıya dönüşür. Bu bağlanma metal iyonları ile gerçekleşirse işleme şelatlama adı verilir. KA'in çeşitli virüslere karşı antiviral etkisi, çeşitli katyon (ör: Fe^{3+} , Cu^{2+}) veya anyonların (MoO_4^{-2} , WO_4^{-2}) ilavesiyle oluşturulan KA şelatları 2.6 varlığında 100 kata kadar artmaktadır. KA şelatları virüs üzerindeki etkilerini replikasyonun erken evresinde, virüsün hücreye bağlanması sırasında gösterirler ve düşük hücre toksisitesine sahiptirler. Etki mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, HSV-1 ve HSV-2 gibi virüslerde viryon glikoproteinleri ile hücre yüzeyindeki heparan sülfat proteoglikanları arasındaki yapışmayı hedeflediği düşünülmektedir. Zira farklı yapışma mekanizmasına sahip virüsler (Zika Virüs, Veziküler Stomatitis Virüs, Rhinovirüs ve Reovirüs) KA şelatlarından etkilenmemektedir (74).

2.7. GÜMÜŞ VE GÜMÜŞ BİLEŞİKLERİ

İnsan hayatında binlerce yıllık geçmişi olan gümüşün, düşük konsantrasyonlarda fazla toksik olmayan doğası, güçlü ve geniş etki spektrumu nedeniyle Hipokrat zamanından beri tıp alanında ve özellikle yaraların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. I.Dünya savaşı sırasında asker yaralarını iyileştirmek için kullanılmış olan gümüş, antibiyotiklerin tıp alanına girmesiyle geri plana itilmiş ise de mikroorganizmaların antibiyotiklere direnç kazanmasıyla yeniden önem kazanmıştır (75, 76).

Gümüş içeren bileşikler bakterileri, mantarları, mayaları ve virüsleri içeren mikroorganizmalar üzerinde biyosidal etkilere sahiptir. Antik çağlarda içine gümüş para atılmış veya gümüşten yapılmış malzemeler gıdaların ve suyun

korunması için kullanılmıştır. Gümüş metalinin antimikrobiyal etkisinin ilk modern tanımı da, 1869 yılında gümüş kaplarda *Aspergillus niger* yetiştiremediğini gözlemleyen Raulin tarafından yapılmıştır (77).

Gümüş insan için fazla toksik olmadığı halde bakterilere, mantarlara, virüslere ve nematodlara karşı geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Mikroorganizmaların duvar ve zarlarına, proteinlerine, çekirdek asitlerine bağlanarak yapılarının tahrip olmasına, enzimlerinin bozulmasına, metabolik faaliyetlerinin durmasına, DNA/RNA hasarına yol açarak ölümlerine neden olur. Bazı bakterilerde sınırlı bir direnç hali bulunmakla birlikte gümüşe karşı direnç gelişimi bildirilmemiştir. Bu durum gümüş iyonlarının antibiyotikler gibi hücre duvarının belli bir bölgesinden değil de etrafını sararak etki etmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir (75, 78).

Özellikle yanık yaralarında başta dirençli mikroorganizmalar (*Pseudomonas aeruginosa*, MRSA gibi) olmak üzere yoğun kontaminasyonun varlığı gümüş bileşiklerinin yaygın kullanımını gerekli kılmıştır. Bu amaçla önceleri gümüş nitrat, 1968'den sonra da GSD kullanılmıştır. Günümüzde nanoteknoloji ile üretilen nanogümüş içerikli malzemeler giderek yoğun şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca gümüş, elementer (metalik) ve kolloidal formlarda da kullanılabilir. Gümüşün iyonik, kolloidal ve nano halleri daha küçük boyuta ve daha fazla yüzey alanına sahip olmaları nedeniyle daha fazla tercih edilmektedir (79). Nanogümüş diğer formlara göre daha yüksek ve uzun süreli etkinlik gösterebilmektedir. Nanogümüş partikülleri bandaj, yara örtüleri, gıda ambalajları, elbise, çamaşır ve kozmetikler gibi geniş bir alanda kullanılmaktadır (76).

Gümüş sıvı ortamda iyonize (Ag^+) olarak etkinlik gösterir. Mikrop öldürücü etki serbestleşen iyon yoğunluğuna bağlıdır. Bu yoğunluk üretim tekniği, çözünürlük derecesi, iyonların bağlanabileceği biyolojik bağların (proteinler, peptitler, halojen iyonlar ...) mevcudiyetiyle yakından ilgilidir. Örneğin gümüş klorür suda zayıf çözündüğünden birkaç saatlik uygulamada yara yerinde ancak 103 ppm Ag^+ iyonları salarken, 20 nm boyutunda daha küçük gümüş nanokristalleri 70-100 ppm Ag^+ iyonları salabilmektedir (75).

Gümüş *Streptococcus pneumonia*, *Corynebacterium diphtheria*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Klebsiella pneumonia*, *Haemophilus influenza*, *Bordetella pertussis* ve *Mycobacterium* türleri gibi bakteriyel patojenlerin çoğunu öldürebilmektedir. Nano gümüşün gram (-) ve gram (+) etkinliğinin yanında metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA), Metisilin dirençli *S.epidermidis*, Vankomisin dirençli enterokoklar, β -laktamaz üreten *K.pneumoniae*, çoklu ilaç dirençli *P.aeruginosa*, ampisilin dirençli *E.coli O157:H7* ve eritromisin dirençli *S.pyogenes* gibi dirençli kökenlere de etkili olduğu görülmüştür. Gümüşün antifungal etkisinin, en güçlü reçeteli antifungal ilaçlardan biri olan ve flukonazolden üstün olan Amfoterisin B 'ye yakın olduğu bilinmektedir (49). Antimikrobiyal etkilere ek olarak gümüşün antiplatelet aktivitesi ve antioksidan etkisi bulunur. Yara iyileşmesi, kemik rejenerasyonu, bağışıklık artışı ve antibiyotik veriminde artış gibi etkileri de mevcuttur. Ayrıca gümüş alkol toksisitesine, üst solunum yolu enfeksiyonlarına ve mide rahatsızlıklarına karşı koruma sağlar.

Gümüş, düşük konsantrasyonda kullanıldığında sağlık açısından yarar sağlayabilir ancak fazla kullanıldığında insan vücuduna zararlı etkileri olabilir. Bu nedenle, özellikle oral uygulama veya inhalasyon söz konusu olduğunda, uzun zaman aralıkları ile fazla miktarda gümüşün kullanımı yerine minimal miktarlarda ve kısa aralıklarla gümüş kullanımı tercih edilir. Ayrıca, gümüş gibi ağır metallerin potansiyel zararlı etkilerinden korunmak için diyetle uygun miktarlarda selenyum, E vitamini gibi anti-oksidanlar ve N-asetil sistein gibi aminoasitler eklemek gerekir (79).

Gümüş insan vücudunda birikmeyen ve fazla toksik olmayan bir maddedir. Ancak mesleki olarak uzun süre gümüşe maruz kalanlarda ciltte mavimsi gri renk değişimi (argyria) ortaya çıkabilmektedir (75). Bu etki daha çok gümüş nitrat ile görülmüştür. Bu kadar geniş spektrumlu bir etkinlik, neredeyse yok denebilecek düzeyde toksisite ve direnç varlığı, gümüşü antimikrobiyal ajan olarak üstün kılmaktadır (49).

Gümüş nitratın %1 çözeltisinin yenidoğan bebeklerin gözüne damlatılarak göz enfeksiyonundan (yenidoğan oftalmisi) korunma yöntemi 1881'de Crede tarafından ortaya konmuştur. Günümüzde bu amaç için daha çok antibiyotikler kullanılmaktadır. Gümüş nitrat dokular üzerinde toksik etki

gösterir ve yara iyileşmesini geciktirir. Nadir olarak methemoglobinemi yapabilir (80).

2.7.1 Gümüş sülfadiazin

Gümüş sülfadiazin; Fox tarafından 1970 yılında gümüş nitrat ve sodyum sülfadiazin'in kombinasyonu ile elde edilmiş, geniş etki spektrumuna sahip bir bileşiktir. Bu kombinasyon ile sülfadiazinin bir hidrojen atomu yerine gümüş atomu geçmiştir ve böylece sülfonamidin antibakteriyel aktivitesi ile gümüşün inhibitör etkisi birleştirilmiştir (81). Gümüş sülfadiazin tüm dünyada yanık yaralarının tedavisinde en çok kullanılan topikal maddedir (82). Bakterisidal ve bakteriyostatik özelliklere sahip olan GSD yara iyileşme sürecinde epitelizasyonu ve granülasyon dokusu oluşumunu indükleyerek yara iyileşme sürecini hızlandırır (83). Sıklıkla suda çözünen %1'lik krem şeklinde kullanılmaktadır.

Gümüş iyonları mikroorganizmanın zarlarına, proteinlerine, DNA'sına bağlanarak etki ederken, sülfonamid ise mikroorganizma metabolizması ile çatışır. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, gram (-) enterik bakteriler ve mantarlar gibi pek çok mikroorganizmaya karşı oldukça etkilidir. Antimikrobik etkinliğini 24 saat kadar sürdürebilmektedir. Yanık yaralarında günde 1 veya 2 kez değiştirilmesi gerekir. Tek başına veya diğer antibakteriyel maddelerle kombine şekilde kullanılabilir. Geniş yanıklardaki topikal uygulamalarda toksik yoğunluğa çıkılması mümkündür. Bu gibi durumlarda geçici lökopeni yapabilmektedir (81)

Gümüş sülfadiazin bileşiği, serum ve diğer NaCl içeren vücut sıvıları ile yavaş ve sürekli bir reaksiyon halindedir ki bu durum yara bölgesinde gümüş iyonlarının yavaş ve sürekli salımına yol açar. Bu koşullar altında, nispeten az miktarda sülfadiazin daha uzun süre etki gösterebilir (49). Sülfadiazin ilaçlarının gümüşle her türlü kombinasyonu in vitro olarak test edilmiştir, ancak GSD'in daha etkili olduğu görülmüştür. Bu etkinlik, GSD'in DNA'ya nispeten güçlü bağlanması ile ilişkili olabilir. Bu bağ GSD'i gümüş nitrat veya diğer gümüş tuzlarına göre ayrıcalıklı kılar (84). Ayrıca GSD, Gümüş nitrat ile karşılaştırıldığında minimum yan etkilere sahip bir bileşiktir (84). Bu nedenle

de özellikle yanık yaralarında tüm dünyada en fazla tercih edilen ve kullanılan topikal antimikrobiyal olma özelliği taşımaktadır (85).

2.8. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ

Antifungal duyarlılık testleri: yeni geliştirilen antifungallerin belirli bir mantara karşı direncini belirlemek, mevcut antifungaller için de en uygun tedavi seçeneğini tespit etmek amacıyla yapılan in vitro deneylerdir (86). Bu testler kullanılan mantarın inokülüm miktarı, besiyeri içeriği ve pH'sı, inkübasyon sıcaklığı ve süresi ile minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerinin saptanmasında kullanılan kriterler de dâhil olmak üzere birçok teknik değişkenden etkilenmektedir (87).

1982 yılında Klinik Laboratuvarlar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından antifungal duyarlılık testi sonuçlarını değerlendirmek için kurulan alt komite 3 yıl boyunca laboratuvarlar arası uyumu ve tekrarlanabilirliği değerlendirmiş, sonuçta laboratuvarlar arası uyumsuzlukları göz önüne alarak antifungal duyarlılık testleri için belli standartlar oluşturmanın gerekli olduğuna karar vermiştir. Yıllar süren çalışmalar sonrasında bu standardizasyon sağlanmış olup CLSI antifungal duyarlılık testi alt komitesi tarafından mayalarda makrodilüsyon, mikrodilüsyon (M27-A3) ile disk difüzyon (M44-A2) ve küflerde makrodilüsyon, mikrodilüsyon (M38-A2) ve disk difüzyon (M51-A) duyarlılık testleri için kılavuzlar hazırlanmıştır. Ayrıca Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) antifungal duyarlılık testi alt komitesi tarafından mayalar ve küfler için benzer mikrodilüsyon yöntemleri geliştirilmiştir (87).

2.8.1 Makrodilüsyon

Sıvı makrodilüsyon yöntemi az sayıda örnekle çalışılan küçük laboratuvarlar için uygun bir yöntemdir ve tüm antifungaller için uygulanabilir. CLSI tarafından önerilen besiyeri L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısı içeren RPMI 1640 sıvı besiyeridir. Besiyeri pH'ı 3-(N-Morpholino) Propanesulfonic Asit (MOPS) çözeltisi ile oda sıcaklığında (25°C) 7.0±0.1 olacak şekilde ayarlanırken son konsantrasyonun 0,165 M olması sağlanır. Makrodilüsyon testi için yuvarlak

tabanlı, kapaklı ve steril polistiren tüpler kullanılır. 35°C'de yapılan 48 saatlik inkübasyon sonrasında tüplerde oluşan bulanıklık ya da üreme görsel olarak değerlendirilir. Mayalarda Amfoterisin B için herhangi bir üreme oluşumunu engelleyen en düşük konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak kabul edilir. Azoller ve flusitozin için ise mayalarda üremeyi %50 oranında azaltan en düşük ilaç konsantrasyonu MİK olarak tanımlanır (88).

2.8.2 Mikrodilüsyon

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi CLSI tarafından önerilen altın standart yöntemdir. Yapılan çalışmalarda makrodilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile elde edilen MİK değerleri karşılaştırılarak laboratuvarlar arası uyumun sıvı mikrodilüsyon yönteminde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (86). Mikrodilüsyon yöntemi RPMI 1640 besiyeri (L-glutaminli, bikarbonatsız ve fenol kırmızılı) kullanılarak gerçekleştirilir. Besiyeri pH'ı MOPS çözeltisi kullanılarak 7.0 ± 0.1 'e ayarlanır. Mikrodilüsyon testi için kullanılacak antifungal madde son konsantrasyonun iki katı yoğunlukta hazırlanır ve 0,5 Mac Farland'a ayarlanmış maya çözeltisi ile eşit miktarda (100 µl) u tabanlı mikropalakaya aktarılır. Mikropalakalar kandidalar için 35°C 'de 24-48 saat süre ile inkübe edilir. Değerlendirme işlemi gözle veya spektrofotometrik olarak yapılır. Amfoterisin B için mayaların üreyemediği ilk kuyucuğa denk gelen konsantrasyon MİK değerini belirler. Azollerde ise kısmi inhibisyon etkisi nedeniyle değerlendirmede zorluklar görülmektedir ve bu yüzden % 50 üreme inhibisyonu oluşturan konsantrasyon MİK olarak belirlenir (CLSI M27-A3) (88, 89)

EUCAST'a göre mikrodilüsyon yönteminde CLSI'dan farklı olarak daha yoğun inokülüm ve %2 dekstroz eklenmiş RPMI besiyeri kullanılmakta olup, 24 saatlik inkübasyonun ardından MİK değerleri spektrofotometrik olarak belirlenir. Bu yöntemin laboratuvar içi tekrarlanabilirliği iyi olup, CLSI mikrodilüsyon yöntemi ile %95 uyumlu bulunmuştur (6).

2.8.3 Kolorimetrik mikrodilüsyon

Bu yöntemde MİK değerlerinin daha kolay okunabilmesi amacı ile kolorimetrik indikatörler veya floresan boyalar kullanılır. Kolorimetrik

yöntemlerle elde edilen MİK değerlerinin standart mikrodilüsyon ve makrodilüsyon yöntemleriyle elde edilen değerlerle oldukça uyumlu (%90) olduğu görülmüştür. Alamar mavisini oksidasyon-redüksiyon kolorimetrik indikatörü (mantar üremesi indikatör renginin maviden pembeye dönüşmesini sağlar) olarak kullanan ticari bir test olan Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems) FLZ, itrakonazol ve flusitozin için FDA onayı almıştır (88).

2.8.4 Disk difüzyon

Dilüsyon testlerine göre daha kolay uygulanabilen ve daha düşük maliyetli bir yöntemdir. Disk difüzyon, duyarlılığı araştırılan mikroorganizmanın inoküle edildiği besiyerine kullanılan antibiyotik çözünmüş kağıt disk test edilecek olan mikroorganizmanın inoküle edildiği katı besiyerine yerleştirilir. Bir süre sonra disk içeriğindeki antibiyotik çözünüp agara doğru difüze olurken, mikroorganizma da besiyerinde çoğalmaya başlar. Belirli bir inkübasyon süresi sonunda ilacın inhibitör konsantrasyonlarının sağlandığı disk çevresinde üreme görülmez. Mikroorganizma ilaca ne kadar hassas ise disk etrafındaki inhibisyon zon çapı o kadar büyük olur. İnhibisyon zon çapı mm olarak ölçülür ve standart duyarlılık tablolarına göre değerlendirilerek mikroorganizmanın kullanılan antimikrobik ajana karşı duyarlılığı belirlenir. CLSI M44-A kılavuzuna göre disk difüzyon yönteminde kandida türleri için FLZ, vorikonazol ve posakonazol duyarlılığı araştırılırken, %2 dekstroz ve 0,5 µg/ml metilen mavisi eklenmiş Mueller Hinton agarda 25 µg'lık FLZ, 5 µg'lık posakonazol ve 1 µg'lık vorikonazol diskleri kullanılır (90).

2.8.5 E test

Bu yöntem besiyerinde difüzyon yoluyla MİK değeri saptamaya yaramaktadır. Bu amaçla test edilecek bakteri 0,5 McFarland yoğunluğa getirilip Mueller Hinton agar yüzeyine steril bir eküvyonla yayılır. Takiben agar yüzeyine, belli bir antibiyotik gradienti içeren E-test şeritleri yerleştirilir. Besiyeri 18-24 saat süreyle 35°C'de inkübe edilir ve şerit etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçükle kesiştiği nokta MİK olarak belirlenir (89).

YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMANIN TASARIMI

Bu çalışmada İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında 01.06.2016 - 08.05.2018 tarihleri arasında yatan hastaların kan kültürü örneklerinden izole edilmiş 2 *C.krusei*, 4 *C.glabrata*, 8 *C.tropicalis*, 8 *C.parapsilosis* ve 8 *C.albicans* suşu ve standart suş olarak *C.krusei* ATCC 6258 kullanıldı. İzole edilen suşlar çalışma yapılana kadar -20°C'de saklandı. Aynı hastadan aynı kandida türünün ikinci kez üremesi durumunda ikinci ve sonraki üremeler çalışmaya dahil edilmedi.

3.2. ÇALIŞMA

Bu çalışmada EA, GA, KA ve GSD'in in vitro antifungal etkisini belirlemek amacıyla kan kültüründen izole edilen kandidalar kullanıldı. Çalışmaya aldığımız kandida kökenleri MALDI-TOF MS (BioMerieux, Fransa) ile tür tanımları doğrulandıktan sonra mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri ile EA, GA, KA ve GSD'in MİK değerleri ve zon çapları ölçülerek değerlendirildi.

Gereç ve Yöntemler

MİKRODİLÜSYON TESTİ: Bu test mikrodilüsyon plakalarına 100 µl sıvı besiyeri ile sulandırılmış maddeler ve 100 µl uygun konsantrasyonda hazırlanmış mikroorganizmanın eklenmesi ile uygulanır. Çalışmamızda mikrodilüsyon testi CLSI M27-A3 (2008) (88) kılavuzu önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

Kimyasal maddeler: Elajik asit, KA ve FLZ; Sigma Aldrich Co., Ltd. (A.B.D)'den, GA; Merck Co., Ltd. (Almanya)'den, GSD; Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd. (Hindistan)'den, RPMI 1640 besiyeri (Sigma Aldrich Co., Ltd., U.S.A.)'den, Dimetil sülfoksit (DMSO) ise AppliChem Co., Ltd.(A.B.D)'den satın alındı.

Stok çözeltilerin hazırlanması: Stok çözeltiler FLZ, EA, GA, KA ve GSD tozunun üretim parti numarasına ait etki gücü (potens) göz önüne alınarak hazırlandı. Standart çözelti hazırlamak için gerekli olan sulandırıcı miktarı CLSI M27-A3'de bulunan aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı ve toz halde tartılmış olan etken madde hesaplanan miktarda DMSO (%100) içinde çözüldü. Stok çözeltilerin konsantrasyonu 32.000 µg/ml olacak şekilde hesaplandı ve kullanım anına kadar -80°C'de muhafaza edildi. Kullanım öncesi -80°C'den çıkarılarak oda ısısına gelene kadar bekletildi.

$$Hacim(L) = \frac{(Kutle(g) \times Potens(mg/g))}{Konsantrasyon(mg/L)}$$

İn vitro antifungal etkinliğine bakılan maddeler ile ilgili bilgiler ve stok çözelti için kullanılan miktarlar tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Flukonazol, Elajik asit, Gallik asit, Kafeik asit ve Gümüş sülfadiazinin özellikleri

Etken Madde	Toz (mg)	Potens	Çözücü (ml)	Firma	Katalog no
Flukonazol	50	98%	DMSO (1,53)	Sigma Aldrich	F8929
Elajik Asit	250	95%	DMSO (7,42)	Sigma Aldrich	E2250
Gallik Asit	250	98%	DMSO (7,65)	Merck	8.42649.0025
Kafeik Asit	250	98%	DMSO (7,65)	Sigma Aldrich	C0625
Gümüş Sülfadiazin	250	98%	DMSO (7,65)	Sisco	60112

Kökenler: Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesinde yatan hastaların kan kültüründen izole edilen ve MALDI-TOF MS (bioMerieux, Fransa) ile tanımlaması yapılmış 8 *C.albicans*, 6 *C.glabrata*, 6 *C.tropicalis*, 8 *C.parapsilosis* ve 2 *C.krusei* olmak üzere toplam 30 köken çalışıldı. Ek olarak 1 *C.krusei* ATCC 6258 kökeni de çalışmaya alındı.

RPMI Besiyeri hazırlama: İn vitro duyarlılık testi CLSI önerileri doğrultusunda 10,4 gr L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız, renk indikatörü olarak fenol kırmızısı içeren toz RPMI 1640 besiyeri 900 ml distile suda çözülüp 34,53 gram MOPS eklendikten sonra NaOH ile pH 7'ye tamponlandı ve steril distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Sterilize etmek amacı ile 0,22 µm'lik filtreden geçirildi. Besiyeri kullanıma kadar +40°C'de saklandı. Kullanım öncesi oda ısısına gelmesi beklendi.

İnokülüm hazırlama: -20°C'de muhafaza edilen kandida kökenleri SDA besiyerine ekildikten sonra 35-37°C'de 24 saat inkübe edildi. Oluşan kandida kolonileri tanımlandıktan sonra her izolat ayrı tüpte, steril %0,85 serum

fizyolojik ile karıştırılarak 15 saniye vortekslendi ve Mac Farlandları spektrofotometre kullanılarak 530 nm'de 0,5'e (1X10⁶-5X10⁶ cfu/ml) ayarlandı. Bu aşamada hedeflenen konsantrasyonu elde etmek için her tüp RPMI 1640 besiyeri ile önce 1:50 sonra 1:20 oranında sulandırıldı ve sonuçta kandida konsantrasyonlarının $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$ cfu/ml olması sağlandı.

Mikrodilüsyon Testi: Mikrodilüsyon testi 96 kuyucuklu u tabanlı mikropalakalarda 100 µl sıvı besiyeri ile sulandırılmış maddeler ve 100 µl uygun konsantrasyonda hazırlanmış mikroorganizmanın eklenmesi ile gerçekleştirildi. İlk aşamada mikropalakadaki 1-10 arası numaralandırılmış kuyucuklara 50 µl, üreme kontrol kuyucuğuna (11 nolu kuyucuk) 100 µl, sterilit kontrol kuyucuğuna (12 nolu kuyucuk) ise 200 µl RPMI 1640 besiyeri konuldu.

İkinci aşamada antifungal etkisine bakılacak maddeler mikropalakadaki kuyucuklara (1-10) konmak üzere uygun konsantrasyonlarda hazırlandı. Her madde için 10 adet 50 ml'lik steril falcon tüpü kullanıldı ve 1-10 arası numaralandırılmış tüplere RPMI 1640 besiyerinden sırasıyla 19 ml, 5 ml, 15 ml, 5 ml, 7,5 ml, 17,5 ml, 5 ml, 7,5 ml, 17,5 ml ve 5 ml konuldu. Ardından 1 numaralı tüpe konsantrasyonu 32.000 g/ml'ye ayarlanmış olan stok çözeltiden 1 ml eklenerek 20 kat seyrelmesi sağlandı. Daha sonra sırasıyla 1 numaralı tüpteki çözeltiden 2 ve 3 numaralı tüplere 5'er ml; 3 numaralı tüpteki yeni çözeltiden 4, 5 ve 6 numaralı tüplere 5 ml, 2,5 ml ve 2,5 ml ; Altı numaralı tüpteki yeni çözeltiden 7, 8 ve 9 numaralı tüplere 5 ml, 2,5 ml ve 2,5 ml; 9 numaralı tüpten ise 10 numaralı tüpe 5 ml eklendi (3.1).



Şekil 3.1: Mikropalakadaki 1-10 numaralı kuyucuklar için gerekli konsantrasyonların hazırlanması

Bu şekilde antifungal etkisi test edilecek maddeler mikropalakadaki her bir kuyucuk (1-10 arası) için gereken son konsantrasyonun (400 - 0,78 g/ml) 4

katına (1.600 - 3,125 g/ml) ayarlandı ve çoklu kanallı mikropipet ile içinde 50 µl RPMI besiyeri bulunan uygun kuyucuklara 50'şer µl dağıtıldı. Son aşamada ise taze hazırlanmış 0,5 MacFarland'lık kandida çözeltileri sterilite kontrol kuyucuğu hariç her bir kuyucuğa 100 µl eklenerek mikroplakalar inkübasyona hazır hale getirildi. Bu aşamada mayaların son konsantrasyonu $0,5 \times 10^3 - 2,5 \times 10^3$ cfu/ml; kuyucuklardaki (1-10) FLZ, EA, GA, KA ve GSD'in konsantrasyon aralığı ise 400-0,78 g/ml oldu.

Üreme ve sterilite kontrolü bütün kökenler için yapıldı. Antifungal etkisi test edilen maddeler her köken için ikişer kez çalışıldı.

Üreme Koşulları: Mikroplakalar 37 °C'de 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra görsel olarak okundu. Elde edilen MİK değerlerinin 24 ve 48. saatlerde değişiklik göstermemiş olması nedeniyle değerlendirmede sadece 24 saatlik inkübasyon sonuçları göz önünde bulunduruldu. Flukonazol, EA, GA, KA ve GSD için MİK olarak %50 üreme inhibisyonu olan kuyucuk seçilirken, üremenin %100 inhibe olduğu kuyucuklar da kaydedildi. 8 *C.albicans*, 6 *C.glabrata*, 6 *C.tropicalis*, 8 *C.parapsilosis* ve 2 *C.krusei* ve 1 *C.krusei* ATCC 6258 kökenleri için EA, GA, KA ve GSD'in antifungal etkinliği MİK-50 değerlerine göre değerlendirildi ve flukonazolün etkinliği ile karşılaştırıldı.

DİSK DİFÜZYON TESTİ: Disk difüzyon testi CLSI M44-A (2004) (90) kılavuzu rehberliğinde yapıldı.

Besiyeri Hazırlama: Toz Mueller Hinton Besiyeri üreticinin önerileri doğrultusunda 1 L için 34 mg olacak şekilde tartıldı. Toz besiyeri 900 ml distile suda çözüldükten sonra üzerine 20 gr glükoz eklendi. Daha sonra bu çözeltiye 20 ml suda çözünmüş 0,1 gr metilen mavisinden 100 µl eklendi ve toplam hacim 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan besiyeri 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril hale getirildi ve petri kutularına 15'er ml dökülüp soğutulduktan sonra +40°C'de muhafaza edildi. Kullanım öncesi besiyerinin oda ısısına gelmesi beklendi.

İnokulum hazırlama: Kandida hücre çözeltileri CLSI M 44-A (2004) (90) önerileri doğrultusunda hazırlandı. SDA'da üretilen maya kolonileri 5 ml steril %0,85 serum fizyolojik ile süspanse edildi ve 15 dk vortekslendi. Spektrofotometre ile MacFarlandları 0,5'e ayarlandı. Disk hazırlama:

Otoklavda sterilize edilmiş 6 mm çapındaki disklerle 32.000 µg/ml hazırlanmış stok çözeltilerden 15'er µl emdirildi ve bu şekilde disklerdeki FLZ, EA, GA, KA ve GSD miktarının 480 g olması sağlandı. Diskler 37°C'de 24 saat bekletilerek kurutuldu.

Disk difüzyon: Steril pamuk çubuk yardımıyla 0,5 Mac Farland'a ayarlanmış maya çözeltilisinden %2 glikozlu Mueller Hinton besiyerinin bütün yüzeyine ekim yapıldı. Hazırlanmış olan diskler 15 dk içinde steril pens yardımı ile besiyeri yüzeyine yerleştirildi ve 35-37°C arasında 24 saat inkübe edildi. Zon çapları ölçülerek kaydedildi. Elajik asit, GA, KA ve GSD için elde edilen zon çapları tablo 4.3'de verildi.

3.3. İSTATİSTİK YÖNTEMLER

Standart buyyon mikrodilüsyon ve disk difüzyon arasındaki ilişki SPSS (Version 22.0 Amork,NY IBM Corp.) Pearson Korelasyon analizi ile değerlendirildi ve p değeri 0.05'ten küçük ise anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

2015 Ocak – 2018 Haziran ayları arasında Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yatan hastalardan elde edilmiş kan kültürülerinden izole edilmiş 30 kandida kökeni ve 1 standart köken çalışmaya alındı.

4.1. Mikrodilüsyon testi sonuçları

Çalışmaya alınan 30 köken ve 1 standart köken için flukonazol, elajik asit, gallik asit, kafeik asit ve gümüş sülfadiazin ile yapılan mikrodilüsyon testi sonucunda *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis* için %50 ve % 100 üreme inhibisyonu sağlayan konsantrasyon değerleri tablo 4.1'de verildi. Antifungal etkinliklerin değerlendirilmesi için MİK-50 değerleri kullanıldı.

4.2. Ortalama MİK değerleri

Test ettiğimiz kandida kökenleri için flukonazol, elajik asit, gallik asit, kafeik asit ve gümüş sülfadiazin için elde edilen MİK aralığı ve ortalama MİK değerleri tablo 4.2'de verildi. Kafeik asit çalıştığımız konsantrasyon aralığında *C.albicans*, *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis* kökenlerine etkili görülmediği için bunların ortalama MİK değerleri hesaplanamadı.

4.3. Disk difüzyon testi sonuçları

Elajik asit, gallik asit, kafeik asit ve gümüş sülfadiazin için disk difüzyon testi sonuçları tablo 4.3'te verildi. Değerlendirmede belirgin zon çapı içindeki küçük üremeler dikkate alınmadı. Flukonazol *C.krusei* kökenleri için 25 mm zon çapı oluştururken diğer kandida kökenlerinde >25 mm zon çapı meydana getirdi. Mikrodilüsyon testi ile bütün kandidalara karşı düşük MİK değerleri elde ettiğimiz gümüş sülfadiazin disk difüzyon testinde ortalama 17.87 mm (0-25 mm) zon çapı oluşturdu. Test ettiğimiz fenolik asitlerden mikrodilüsyon

Tablo 4.1: 24 saatlik inkübasyon sonrası flukonazol, elajik asit, gallik asit, kafeik asit ve gümüş sülfadiazinin *C.krusei*, *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* ve *C.albicans* için %50 ve %100 üreme inhibisyonu sağlayan MİK değerleri (µg/ml)

Kökenler	Flukonazol		Gümüş Sülfadiazin		Elajik asit		Galli kasiat		Kafeik asit	
	50%	100%	50%	100%	50%	100%	50%	100%	50%	100%
<i>C.krusei</i> ATCC 6258	25	100	1,56	3,125	0,78	100	6,25	200	200	>400
<i>C.krusei</i>	25	100	1,56	3,125	0,78	100	25	200	400	>400
<i>C.krusei</i>	25	100	1,56	3,125	0,78	100	25	200	400	>400
<i>C.glabrata</i>	1,56	>400	1,56	6,25	0,78	>400	3,125	>400	6,25	>400
<i>C.glabrata</i>	1,56	>400	1,56	6,25	0,78	>400	3,125	400	6,25	>400
<i>C.glabrata</i>	1,56	>400	1,56	6,25	0,78	>400	12,5	200	25	>400
<i>C.glabrata</i>	3,125	>400	1,56	6,25	0,78	>400	6,25	>400	25	>400
<i>C.tropicalis</i>	1,56	25	1,56	6,25	0,78	>400	12,5	>400	25	>400
<i>C.tropicalis</i>	1,56	50	1,56	12,5	0,78	>400	12,5	>400	25	>400
<i>C.tropicalis</i>	1,56	>400	1,56	12,5	25	>400	50	>400	>400	>400
<i>C.tropicalis</i>	1,56	>400	1,56	12,5	25	>400	200	>400	>400	>400
<i>C.tropicalis</i>	1,56	>400	1,56	12,5	25	>400	50	>400	>400	>400
<i>C.tropicalis</i>	1,56	>400	1,56	12,5	25	>400	200	>400	>400	>400
<i>C.tropicalis</i>	1,56	>400	1,56	12,5	25	>400	50	>400	>400	>400
<i>C.tropicalis</i>	1,56	>400	1,56	12,5	25	>400	100	>400	>400	>400
<i>C.tropicalis</i>	1,56	>400	1,56	12,5	25	>400	100	>400	>400	>400
<i>C.tropicalis</i>	1,56	>400	1,56	12,5	25	>400	200	>400	>400	>400
<i>C.parapsilosis</i>	0,78	6,25	1,56	3,125	3,125	>400	100	400	400	>400
<i>C.parapsilosis</i>	0,78	3,125	1,56	6,25	3,125	>400	100	>400	>400	>400
<i>C.parapsilosis</i>	0,78	3,125	0,78	6,25	3,125	200	100	>400	>400	>400
<i>C.parapsilosis</i>	0,78	1,56	0,78	6,25	3,125	200	100	>400	>400	>400
<i>C.parapsilosis</i>	0,78	3,125	0,78	6,25	3,125	>400	200	>400	>400	>400
<i>C.parapsilosis</i>	0,78	6,25	0,78	6,25	3,125	>400	50	>400	>400	>400
<i>C.parapsilosis</i>	0,78	3,125	0,78	6,25	3,125	>400	200	>400	>400	>400
<i>C.parapsilosis</i>	0,78	3,125	0,78	1,56	3,125	>400	200	>400	>400	>400
<i>C.albicans</i>	0,78	>400	0,78	1,56	1,56	>400	50	>400	100	>400
<i>C.albicans</i>	0,78	>400	0,78	3,125	1,56	>400	100	>400	400	>400
<i>C.albicans</i>	0,78	>400	0,78	3,125	6,25	>400	200	>400	400	>400
<i>C.albicans</i>	0,78	>400	0,78	3,125	6,25	>400	200	>400	400	>400
<i>C.albicans</i>	0,78	>400	0,78	3,125	50	>400	200	>400	>400	>400
<i>C.albicans</i>	0,78	>400	0,78	3,125	12,5	>400	200	>400	>400	>400
<i>C.albicans</i>	0,78	>400	0,78	3,125	50	>400	200	>400	>400	>400
<i>C.albicans</i>	0,78	>400	0,78	3,125	50	>400	200	>400	>400	>400

Tablo 4.2: Elajik asit, gallik asit, kafeik asit ve gümüş sülfadiazinin MİK aralığı ($\mu\text{g/ml}$) ve ortalama MİK değerleri ($\mu\text{g/ml}$)

Etken Madde	Köken	Sayı	MİK Aralığı	Ortalama MİK
Flukonazol	<i>C.krusei</i>	3	25	25
	<i>C.glabrata</i>	4	1,56-3,125	1,95
	<i>C.tropicalis</i>	8	1,56	1,56
	<i>C.parapsilosis</i>	8	0,78	0,78
	<i>C.albicans</i>	8	0,78	0,78
Elajik Asit	<i>C.krusei</i>	3	0,78	0,78
	<i>C.glabrata</i>	4	0,78	0,78
	<i>C.tropicalis</i>	8	0,78-50	25,19
	<i>C.parapsilosis</i>	8	3,125	3,125
	<i>C.albicans</i>	8	1,56-50	22,26
Gallik asit	<i>C.krusei</i>	3	6,25-25	18,75
	<i>C.glabrata</i>	4	3,125-12,5	6,25
	<i>C.tropicalis</i>	8	12,5-200	90,62
	<i>C.parapsilosis</i>	8	50-200	131,25
	<i>C.albicans</i>	8	50-200	168,75
Kafeik asit	<i>C.krusei</i>	3	200-400	333,33
	<i>C.glabrata</i>	4	6,25-25	15,62
	<i>C.tropicalis</i>	8	25->400	-
	<i>C.parapsilosis</i>	8	400->400	-
	<i>C.albicans</i>	8	100->400	-
Gümüş sülfadiazin	<i>C.krusei</i>	3	1,56	1,56
	<i>C.glabrata</i>	4	1,56	1,56
	<i>C.tropicalis</i>	8	0,78-1,56	0,975
	<i>C.parapsilosis</i>	8	0,78-1,56	1,26
	<i>C.albicans</i>	8	0,78	0,78

testi ile en etkili bulduğumuz elajik asit ortalama 7.29 mm (0-11 mm) zon çapı oluştururken, gallik asit ortalama 2.96 mm (0-8 mm) zon çapı oluşturdu. Kafeik asit ise hiçbir kandida kökenine karşı zon oluşturamadı. Altın standart yöntem olan mikrodilüsyon ile disk difüzyon testi arasında elajik asit, gallik asit, kafeik asit ve gümüş sülfadiazin için anlamlı bir korelasyon bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 4.3: Elajik asit, gallik asit, kafeik asit ve gümüş sülfadiazinin disk difüzyon testi sonucu ölçülen zon çapları (mm)

	Gümüş sülfadiazin	Elajik asit	Gallik asit	Kafeik asit
<i>C.krusei</i> ATCC 6258	25	9	8	0
<i>C.krusei</i>	20	9	8	0
<i>C.krusei</i>	20	8	7	0
<i>C.glabrata</i>	22	10	0	0
<i>C.glabrata</i>	22	10	0	0
<i>C.glabrata</i>	25	10	0	0
<i>C.glabrata</i>	22	10	8	0
<i>C.tropicalis</i>	25	11	0	0
<i>C.tropicalis</i>	7	9	0	0
<i>C.tropicalis</i>	15	10	8	0
<i>C.tropicalis</i>	15	7	0	0
<i>C.tropicalis</i>	20	8	7	0
<i>C.tropicalis</i>	22	7	7	0
<i>C.tropicalis</i>	18	8	0	0
<i>C.tropicalis</i>	10	8	0	0
<i>C.parapsilosis</i>	20	8	0	0
<i>C.parapsilosis</i>	25	9	8	0
<i>C.parapsilosis</i>	20	10	8	0
<i>C.parapsilosis</i>	25	10	8	0
<i>C.parapsilosis</i>	22	9	8	0
<i>C.parapsilosis</i>	20	10	0	0
<i>C.parapsilosis</i>	9	9	0	0
<i>C.parapsilosis</i>	0	7	0	0
<i>C.albicans</i>	22	0	0	0
<i>C.albicans</i>	24	10	7	0
<i>C.albicans</i>	15	0	0	0
<i>C.albicans</i>	15	0	0	0
<i>C.albicans</i>	12	0	0	0
<i>C.albicans</i>	18	10	0	0
<i>C.albicans</i>	7	0	0	0
<i>C.albicans</i>	12	0	0	0
Ortalama zon çapı	17,87	7,29	2,96	0

TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. TARTIŞMA

Kandida türleri özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda yüksek mortalite oranlarına sahip fırsatçı enfeksiyonlara neden olan önemli bir mantar grubu olup görülme sıklığı giderek artmaktadır. Bu enfeksiyonlara karşı hala kullanılabilen sınırlı sayıdaki antifungal ilacın istenmeyen yan etkileri ve toksisiteleri yanında artan direnç sorunları tedavide büyük zorluklar oluşturmaktadır. Etkenlerin biyofilm oluşturma özelliği de sözkonusu ilaçların etkinliğini büyük ölçüde engellemektedir. Bütün bunlar etkin ve güvenilir yeni tedavi alternatiflerine ihtiyacı artırmaktadır. Bu alandaki araştırmalar doğal bitkisel ekstrater üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır. Bu ekstraterde bulunan pek çok fenolik bileşimin diğer mikroorganizmaların yanı sıra kandida türlerine karşı da etkin olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir. Ancak bunların etkinliği elde edildikleri kaynağa, içerdikleri bileşimin cinsine, miktarına, saflık derecesine ve beraberinde bulunan diğer maddelerin etkisine göre değişebilmektedir. Ayrıca kullanılan yöntemler ve etkinlik değerlendirme kriterlerindeki farklılıklar da sonuçların birbiriyle karşılaştırılmasını bir hayli zorlaştırmaktadır (37, 91).

Fenolik asitler en önemli doğal antioksidan maddelerden biridir. Bunların insan sağlığı üzerinde çok çeşitli (antienflamatuvar, antialerjik, antidiyabetik, antitümör, bağışıklığı güçlendirici gibi...) etkileri yanında geniş bir antimikrobik aktiviteleri bulunmaktadır (48). Etki mekanizmaları tam olarak ortaya konulmamış ise de genel olarak mikroorganizmaların hücre duvar ve zarlarını bozdukları, enzimlerini, toksinlerini etkisizleştirdikleri, ayrıca biyofilm oluşumunu engelledikleri gösterilmiştir (37, 44, 59, 61). Bunların yanı sıra bağışıklık sistemini güçlendirerek ve diğer kemoterapötiklerle sinerjik etki oluşturarak da enfeksiyonlara karşı mücadelede önemli rol oynarlar (37).

Diğer yandan çok eski zamanlardan beri yara ve enfeksiyon tedavisinde kullanılmakta olan gümüş bileşikleri günümüzde de önemini korumaktadır. Bunlar arasında özellikle GSD yüksek etki gücü ve dikkate değer bir yan etkisinin olmaması nedeniyle yanık yaralarının tedavisinde geniş çapta kullanılmaktadır. Gümüş sülfadiazinin bakteri, virüs ve mantarlara karşı geniş bir etki spektrumu bulunmaktadır. Kandidalar üzerinde membran değişikliği yaptığı, boru teşekkülünü engellediği ve DNA replikasyonunu durdurduğu gösterilmiştir (92).

Mevcut çalışmamızda fenolik bileşiklerden EA, GA, KA ve GSD; FLZ ile karşılaştırmalı şekilde kandida türlerine karşı denenmiştir. Bu amaçla hastanemizde yatmakta olan hastaların kan kültürlerinden izole edilmiş 30 farklı kandida kökeni ve 1 adet *C.krusei* ATCC 6258 kökeni sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemiyle incelemeye alınmıştır.

İncelediğimiz fenolik bileşikler arasında en yüksek antifungal etkiyi EA göstermiştir. Etkinlik sırasına göre ortalama MİK değerleri *C.krusei* ve *C.glabrata* için 0,78 µg/ml, *C.parapsilosis* için 3,125 µg/ml, *C.albicans* için 22.26 (1,56-50) µg/ml ve *C.tropicalis* için 25.19 (0,78-50) µg/ml bulunmuştur. Bu sonuçlar EA'ın FLZ dirençli *C.krusei* için de etkin bir alternatif olabileceğini göstermektedir.

Elajik asit ile yapılmış başka çalışmalarda *C.albicans* için 7,81-125 µg/ml (93) ve 25 µg/ml (59) gibi bizimkine yakın sonuçlar bildirildiği gibi 1000 µg/ml (94) gibi çok daha yüksek MİK değerleri de bulunmaktadır. *C.parapsilosis* için bizim MİK değerimiz 3,125 µg/ml iken, Theodore ve ark. çalışmasında bu değer 1 mg/ml (1000 µg/ml) olarak bildirilmiştir (94). *C.tropicalis* ve *C.glabrata* için de söz konusu çalışmalarda bizimkinden yüksek MİK değerleri tespit edilmiştir. Zhi Jian Li ve ark. EA MİK değerini *C.tropicalis* için 75 µg/ml, *C.glabrata* için >100 µg/ml olarak bildirmiştir (59). Theodore ve ark. ise *C.tropicalis* için 1 mg/ml (1000 µg/ml), *C.krusei* için 125 µg/ml, *C.glabrata* için 4 µg/ml MİK değeri vermişlerdir (94). Barros ve ark. da diğer kandida türlerine göre *C.glabratayı* EA'e daha duyarlı bulmuşlardır (95). *C.glabrata* ile ilgili bu sonuçlar bizim bulgularımız ile örtüşmektedir.

İncelediğimiz fenolik bileşikler arasında EA'den sonra ikinci sırada antifungal etkinlik gösteren; GA olmuştur. Etkinlik sırasına göre GA ortalama MİK değerleri *C.glabrata* için 6,25 (3,125-12,5) µg/ml, *C.krusei* için 18,75 (6,25-27) µg/ml, *C.tropicalis* için 90,62 (12,5-200) µg/ml, *C.parapsilosis* için 131,25 (50-200) µg/ml ve *C.albicans* için 168,25 (50-200) µg/ml olarak tespit edilmiştir. Gallik asit ile yapılmış diğer çalışmalarda *C.albicans* için 1,78-10.000 µg/ml arasında değişen geniş bir MİK aralığı verilmektedir (61, 93, 94, 96-99). *C.parapsilosis* için 16 µg/ml (99), 100 µg/ml (98), <156 µg/ml (100), 8.000 µg/ml (93), 10.000 µg/ml (94); *C.glabrata* için 8 µg/ml (94), 100 µg/ml (61); *C.krusei* için 100 µg/ml (98), 8.000 µg/ml (94) MİK değerleri bildirilmiştir.

Değerlendirdiğimiz bileşikler arasında en düşük etkiyi KA göstermiştir. Kafeik asit ortalama MİK değerlerimiz *C.glabrata* için 15,62 (6,25-25) µg/ml, *C.krusei* için ise 333,33 (200-400) µg/ml olarak bulunmuştur ancak *C.albicans*, *C.parapsilosis* ve *C.tropicalis* için hesaplanamamıştır. Diğer çalışmalarda *C.albicans* için 8 µg/ml (99), 128 µg/ml (101) ve 1.000 µg/ml (102) MİK değerleri bildirilmiştir. Özçelik ve ark. *C.parapsilosis* için de bizim sonucumuzdan oldukça oldukça düşük KA MİK değeri (8 µg/ml) elde etmişlerdir (99).

Fenolik asitlerle ilgili yapılmış çalışmalar arasında büyük farklılıkların olması diğer faktörler yanında yöntem ve değerlendirme standardizasyonunun tam olarak oluşmamasıyla ilgilidir. Çoğu çalışmada sıvı mikrodilüsyon testi kullanılmakla birlikte bazı çalışmalarda agar dilüsyon testi uygulanmıştır (Rangkadilok ve ark.) (93). CLSI M27-A3'e göre kandidalar için MİK-50 değeri önerilmekle birlikte bazı çalışmalarda %80 inhibisyon (61), bazılarında ise tam inhibisyon (93, 94) kriter olarak alınmıştır. Bu durum sonuçların sağlıklı bir şekilde karşılaştırılmasını imkansız hale getirmektedir. Diğer yandan genelde az sayıda kökenle çalışılmış olması ve bunların duyarlılık farkları da sonuçları etkilemektedir. Bu nedenle fazla sayıda örnekle ve standart yöntemlerle çalışılması gerekmektedir.

Fenolik asitler için etkinlik sınırları belirlemek kolay değildir. Bu konuda da farklı değerlendirmeler kullanılmaktadır. Bir çalışmada 1.000 µg/ml üzerindeki MİK değerleri etkisiz kabul edilirken (103), bir başka çalışmada

500 µg/ml altındaki değerler güçlü etkili, 500-1.500 µg/ml değerleri zayıf etkili, 1.500 µg/ml üzerindeki değerler de etkisiz olarak sınıflandırılmıştır (95). Dolayısıyla standart bir duyarlılık aralığı oluşturmak henüz mümkün görünmemektedir.

Çalışmamızda bir diğer önemli bulgu GSD'in deneğimiz tüm kökenlere yüksek bir etkinlik (MİK değeri 0,78-1,56 µg/ml) göstermiş olmasıdır. Miller ve arkadaşları agar dilüsyon yöntemiyle GSD'in etkinliğini inceledikleri çalışmalarında kandidalar için MİK değerini 64 µg/ml olarak belirlemişlerdir (104). Wlodkowski ve arkadaşları da aynı yöntemle *C.albicans* için GSD MİK değerini 3-100 µg/ml aralığında tespit etmişlerdir (105). Bizim değerlerimizin çok daha düşük çıkması kullanılan yöntemle ilgili görünmektedir. Buyyon mikrodilüsyon testi antifungal duyarlılık için CLSI tarafından standart yöntem olarak belirlenmiştir. Katı ortamda bazı antifungaller için difüzyon zorluğu olabilmektedir. Mikrodilüsyon yöntemi ile disk difüzyon yöntemi arasındaki uyum FLZ için 2949 kandida kökeniyle yapılan çok merkezli bir çalışmada ortalama %87.4 (*C.albicans* için %97.7, *C.glabrata* için %60.6) olarak bildirilmiştir. Özellikle non albicans kökenlerde yanlış dirençli sonuçlar olabileceği belirtilmektedir (106).

Çalışmamızda MİK değerinin yanısıra incelediğimiz kandida kökenlerine karşı disk difüzyon yöntemi de uygulandı. 480 µg/ml etken madde içeren disklerle 48 saat inkübasyon sonucu elde ettiğimiz zon çapları (mm) ile MİK değerleri arasında beklenen korelasyonun olmadığı tespit edildi. Örneğin aynı MİK değerine sahip kökenler arasında zon çapları büyük farklılıklar gösterdi. Çok düşük MİK değeri olan bazı kökenler hiç zon oluşturmadı. Bu durum disk difüzyon yönteminin kandida türleri için güvenilir bir yöntem olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda FLZ *C.krusei* dışındaki tüm kökenlere yüksek etkinlikte (MİK:0,78-3,125 µg/ml) bulunmuştur. Flukonazol duyarlılığını belirlemede mikrodilüsyon yöntemi altın standart olarak kabul edilir. Ancak bazı çalışmalarda E-test yönteminin de yüksek oranda uyumlu olduğu belirtilmektedir (106, 107).

5.2. TEZİN KISITLILIKLARI

- Bu alışma kısıtlı sayıda köken ile gerçekleştirilmiş olup, daha fazla sayıda köken ile çalışılarak daha net sonuçlar elde edilebilir.
- Özellikle alışılan MİK aralığında etkili bulunmayan fenolik asitler için daha ileri konsantrasyonlarda çalışılarak etkili oldukları MİK değeri tespit edilmelidir.
- Tespit edilen MİK değerlerinin düşük olması yüksek etkiyi gösterir. Ancak özellikle fenolik asitlerin hangi MİK'in üzerinde kandidalara etkisiz kabul edileceğini belirlemek için daha ileri çalışmaların yapılması gerekir.
- İn vitro koşullarda çalıştığımız maddelerin in vivo koşullarda etkili olup olmadığı da test edilmelidir.

5.3. SONUÇ

Sonuç olarak elajik asit, gallik asit, kafeik asit ve gümüş sülfadiazin vitro şartlarda kandidalara karşı değişik düzeylerde antifungal etkinlik göstermiştir.

Elajik asit başta *C.krusei*, *C.glabrata* ve *C.parapsilosis* olmak üzere tüm kökenlere etkili bulunmuştur. Gallik asit en fazla etkiyi *C.glabrata* ve *C.krusei*'ye; kafeik asit ise *C.glabrata*'ya karşı göstermiştir.

Gümüş sülfadiazin tüm kökenlere karşı yüksek bir etkinlik göstermiştir. Hatta flukonazolün tam inhibisyon (MİK-100) gösteremediği kökenler de dahil olmak üzere 1,56-12,5 µg/ml aralğında tüm kökenleri tam olarak inhibe etmiştir. Ayrıca flukonazol doğal dirençli *C.krusei* kökenlerine karşı elajik asit, gallik asit ve gümüş sülfadiazin etkili olmuştur.

Bu sonuçlar alternatif antifungaller konusunda gelecek için ümit verici olmakla birlikte bu çalışmaların daha kapsamlı ve standart yöntemlerle yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Ayrıca in vitro deneylerde olumlu sonuçlar elde edilmiş olmakla birlikte bu sonuçların in vivo deneylerle de desteklenmesi gerekir.

Kaynaklar

1. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms [Journal Article]. *Virulence*. 2013;4(2):119–128.
2. Poulain D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis [Journal Article]. *Critical reviews in microbiology*. 2015;41(2):208–217.
3. Çerikçiöğlu N. *Candida* Türleri. Nobel Tıp Kitabevi; 2017.
4. Delaloye J, Calandra T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient [Journal Article]. *Virulence*. 2014;5(1):161–169.
5. Seyedmousavi S, İlkit M, Durdu M, Ergin a, Polat SH, Melchers W, et al. *Candida* ve Kandidoz: Epidemiyoloji, Tanı, Tedavi, Antifungal İlaç Direnci ve Konağın Genetik Yatkınlığında Güncel Durum [Journal Article]. *Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi*. 2015;45(1):1-11.
6. GÜLAT S. Flukonazol dirençli *Candida albicans* suşlarında atım pompalarını kodlayan genlerin ekspresyon düzeylerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi ile araştırılması [PhD]; 2013.
7. Tümbay E. Temel ve klinik mikrobiyoloji. Ankara: Öncü Basınevi; 1999.
8. Nogueira M, Istel F, Jenull S, Walker L, Gow N, Lion T. Quantitative Analysis of *Candida* Cell Wall Components by Flow Cytometrywith Triple-Fluorescence Staining [Journal Article]. *Journal of Microbiology and modern techniques*. 2017;.
9. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance [Journal Article]. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(2):288–305. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21569057>.
10. Ten Cate J, Klis F, Pereira-Cenci T, Crielaard W, De Groot P. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation [Journal Article]. *Journal of dental research*. 2009;88(2):105–115.
11. Richardson JP, Moyes DL. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection [Journal Article]. *Virulence*. 2015;6(4):327–337.

12. Çerikcioglu N. Mantarlarda virülans faktörleri [Journal Article]. *ANKEM Dergisi*. 2012;26(4):261– 269.
13. Gacser A. Adhesins in *Candida parapsilosis*: Understudied players in virulence [Journal Article]. *Virulence*. 2016;7(2):65–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26713939>.
14. Sasse C, Hasenberg M, Weyler M, Gunzer M, Morschhäuser J. White-opaque switching of *Candida albicans* allows immune evasion in an environment-dependent fashion [Journal Article]. *Eukaryotic cell*. 2013;12(1):50–58.
15. Alvandian A, Jawadi MH, Altıntaş ZN, Yıldız N, Karaman M. *Candida albicans*' in Salgısal Asit Proteinaz Etkinliğinin Araştırılmasında In Vivo Model Olarak *Galleria mellonella* Larvanın Kullanılması [Journal Article;].
16. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis [Journal Article]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003;67(3):400–428.
17. Pekintürk N, DEĞERLİ K, Özkütük N, ECEMİŞ T, Kurutepe S, ÖZBAKKALOĞLU B. *Candida albicans* Suşlarının Fosfolipaz, Esteraz ve Slime Aktivitelerinin Enfeksiyon-Kolonizasyon Ayrımındaki Rollerini [Journal Article]. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2012;32(1):171–176.
18. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. Pathogenicity determinants of *Candida* [Journal Article]. *Cerrahpaşa J Med*. 2000;31(3):172–86.
19. Roemer T, Krysan DJ. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches [Journal Article]. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(5). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24789878>.
20. Dreizen S. Oral candidiasis [Journal Article]. *The American journal of medicine*. 1984;77(4D):28–33.
21. Metin A, Dilek N, Bilgili SG. Recurrent candidal intertrigo: challenges and solutions [Journal Article]. *Clinical, cosmetic investigational dermatology*. 2018;11:175.
22. Lipner SR, Scher RK. Part I: Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis [Journal Article]. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2018;.

23. Masago K, Irie K, Fujita S, Imamichi F, Okada Y, Katakami N, et al. Relationship between Paronychia and Drug Concentrations of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors [Journal Article]. *Oncology*. 2018;95(4):251–256.
24. Khosravi AR, Shokri H, Darvishi S. Altered immune responses in patients with chronic mucocutaneous candidiasis [Journal Article]. *Journal de mycologie medicale*. 2014;24(2):135–140.
25. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America [Journal Article]. *Clinical Infectious Disease*. 2015;62(4):e1–e50.
26. Kadosh D, BROMKWWNea, Najvar LK. Effect of antifungal treatment in a diet-based murine model of disseminated candidiasis acquired via the gastrointestinal tract. [Journal Article]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(11):6703–6708.
27. Humphrey DM, Weiner MH. Candidal antigen detection in pulmonary candidiasis [Journal Article]. *The American journal of medicine*. 1983;74(4):630–640.
28. Arnold CJ, Johnson M, Bayer AS, Bradley S, Giannitsioti E, Miro JM, et al. Candida infective endocarditis: an observational cohort study with a focus on therapy [Journal Article]. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(4):2365–73. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25645855>.
29. Malhotra S, Sharma S, Bhatia N, Kumar P, Bhatia N, Patil V, et al. Recent diagnostic techniques in mycology. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis*. 2014;3(3):1.
30. Buschelman B, Jones RN, Pfaller MA, Koontz FP, Doern GV. Colony morphology of *Candida* spp. as a guide to species identification. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 1999;35(1):89–91.
31. Perlin DS. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance [Journal Article]. *Annals of the new York Academy of Sciences*. 2015;1354(1):1–11.
32. Serhan G, Stack CM, Perrone GG, Morton CO. The polyene antifungals, amphotericin B and nystatin, cause cell death in *Saccharomyces cerevisiae* by a distinct mechanism to amphibian-derived

- antimicrobial peptides. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2014;13(1):18.
33. Sanglard D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. [Journal Article]. *Frontiers in medicine*. 2016;3:11.
34. Sanglard D, Coste A. Activity of Isavuconazole and Other Azoles against Candida Clinical Isolates and Yeast Model Systems with Known Azole Resistance Mechanisms [Journal Article]. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(1):229–38. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26482310>.
35. Stan TCESCI Catalina Daniela. Echinocandins-new antifungal agents [Journal Article]. *The Medical-Surgical Journal*. 2014;118(2):528–536.
36. Kristanc L, Svetina S, Gomišček G. Effects of the pore-forming agent nystatin on giant phospholipid vesicles [Journal Article]. *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes*. 2012;1818(3):636–644.
37. Teodoro GR, Ellepola K, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY. Potential Use of Phenolic Acids as Anti-Candida Agents: A Review [Journal Article]. *Front Microbiol*. 2015;6:1420. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26733965>.
38. Barros L, Dueñas M, Alves CT, Silva S, Henriques M, Santos-Buelga C, et al. Antifungal activity and detailed chemical characterization of Cistus ladanifer phenolic extracts [Journal Article]. *Industrial Crops and Products*. 2013;41:41–45.
39. Cetin-Karaca H, Newman MC. Antimicrobial efficacy of natural phenolic compounds against gram positive foodborne pathogens [Journal Article]. *Journal of Food Research*. 2015;4(6):14.
40. Ghudhaib KK, Hanna ER, Jawad AH. Effect of ellagic acid on some types of pathogenic bacteria [Journal Article]. *Journal of Al-Nahrain University-Science*. 2010;13(2):79–85.
41. Zabka M, Pavela R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi [Journal Article]. *Chemosphere*. 2013;93(6):1051–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800587>.
42. C I. Gallik asit esterlerinin lipaz enzimi ile üretim parametrelerinin incelenmesi [Thesis]; 2016.

43. Magnani C, Isaac VLB, Correa MA, Salgado HRN. Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics [Journal Article]. *Analytical Methods*. 2014;6(10):3203–3210.
44. Borges A, Ferreira C, Saavedra MJ, Simoes M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria [Journal Article]. *Microbial Drug Resistance*. 2013;19(4):256–65. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23480526>.
45. Merkl R, HRádkoVá I, Filip V. Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters [Journal Article]. *Journal of Food Sciences*. 2010;28(4):275–279.
46. Ceci C, Lacal PM, Tentori L, De Martino MG, Miano R, Graziani G. Experimental Evidence of the Antitumor, Antimetastatic and Antiangiogenic Activity of Ellagic Acid [Journal Article]. *Nutrients*. 2018;10(11). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30441769>.
47. Kiasalari Z, Heydarifard R, Khalili M, Afshin-Majd S, Baluchnejadmojarad T, Zahedi E, et al. Ellagic acid ameliorates learning and memory deficits in a rat model of Alzheimer's disease: an exploration of underlying mechanisms [Journal Article]. *Psychopharmacology (Berl)*. 2017;234(12):1841–1852. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28303372>.
48. Deveci H, Nur G, Kırpık M, Harmankaya A, Yıldız Y. Fenolik bileşik içeren bitkisel antioksidanlar [Journal Article]. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2016;9(1), s26-32.
49. Saldanha JNRRKASVFRBMS E. Polyphenols in the prevention of acute pancreatitis: preclinical observations. [Journal Article]. *In Polyphenols in Human Health and Disease*. 2014;p. pp. 427–433.
50. Reddy BU, Mullick R, Kumar A, Sudha G, Srinivasan N, Das S. Small molecule inhibitors of HCV replication from pomegranate [Journal Article]. *Sci Rep*. 2014;4:5411. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24958333>.
51. Miyasaki Y, Rabenstein JD, Rhea J, Crouch ML, Mocek UM, Kittell PE, et al. Isolation and characterization of antimicrobial compounds in plant extracts against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [Journal Article]. *PLoS One*. 2013;8(4):e61594. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23630600>.

52. De R, Sarkar A, Ghosh P, Ganguly M, Karmakar BC, Saha DR, et al. Antimicrobial activity of ellagic acid against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice [Journal Article]. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(6):1595–1603. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29566160>.
53. Bindu I, Jayachandran VP, Elcey CD. Evaluation of Antistaphylococcal Activity of Ellagic Acid Extracted from *Punica granatum* Fruit Peel on MRSA [Journal Article]. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 2016;5(2):245–253.
54. Abuelsaad AS, Mohamed I, Allam G, Al-Solumani AA. Antimicrobial and immunomodulating activities of hesperidin and ellagic acid against diarrheic *Aeromonas hydrophila* in a murine model [Journal Article]. *Life Sci.* 2013;93(20):714–22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24090709>.
55. Nayeem N, Karvekar MD. Anti microbial and anti-oxidant properties of the isolated compounds from the methanolic extract from the leaves of *Tectona grandis* [Journal Article]. *Journal of basic and clinical pharmacy.* 2011;2(4), 163.
56. Chen GH, Lin YL, Hsu WL, Hsieh SK, Tzen JTC. Significant elevation of antiviral activity of strictinin from Pu'er tea after thermal degradation to ellagic acid and gallic acid [Journal Article]. *J Food Drug Anal.* 2015;23(1):116–123. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28911434>.
57. Li J, Huang H, Zhou W, Feng M, Zhou P. Anti-hepatitis B virus activities of *Geranium carolinianum* L. extracts and identification of the active components [Journal Article]. *Biological Pharmaceutical Bulletin.* 2008;31(4):743–747.
58. Soh PN, Witkowski B, Olagnier D, Nicolau ML, Garcia-Alvarez MC, Berry A, et al. In vitro and in vivo properties of ellagic acid in malaria treatment [Journal Article]. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(3):1100–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015354>.
59. Li ZJ, Guo X, Dawuti G, Aibai S. Antifungal Activity of Ellagic Acid In Vitro and In Vivo [Journal Article]. *Phytother Res.* 2015;29(7):1019–25. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25919446>.
60. Pant AF, Dorn J, Reinelt M. Effect of Temperature and Relative Humidity on the Reaction Kinetics of an Oxygen Scavenger Based on Gallic Acid

- [Journal Article]. *Front Chem.* 2018;6:587. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30538982>.
61. Li ZJ, Liu M, Dawuti G, Dou Q, Ma Y, Liu HG, et al. Antifungal Activity of Gallic Acid In Vitro and In Vivo [Journal Article]. *Phytother Res.* 2017;31(7):1039–1045. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28524381>.
62. HESAP E. Modeling of Gallic Acid Diffusion: Case Study on *Cinnamomum zeylanicum* [Journal Article]. *Eurasian Journal of Food Science and Technology.* 2016;28-38.
63. Yan X, Zhang YL, Zhang L, Zou LX, Chen C, Liu Y, et al. Gallic Acid Suppresses Cardiac Hypertrophic Remodeling and Heart Failure [Journal Article]. *Molecular nutrition food research.* 2018;1800807.
64. Mirshekar MA, Sarkaki A, Farbood Y, Gharib Naseri MK, Badavi M, Mansouri MT, et al. Neuroprotective effects of gallic acid in a rat model of traumatic brain injury: behavioral, electrophysiological, and molecular studies [Journal Article]. *Iran J Basic Med Sci.* 2018;21(10):1056–1063. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30524680>.
65. Pinho E, Ferreira IC, Barros L, Carvalho AM, Soares G, Henriques M. Antibacterial potential of northeastern Portugal wild plant extracts and respective phenolic compounds [Journal Article]. *Biomed Res Int.* 2014;2014:814590. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24804249>.
66. Bajpai B, Patil SJB, JoM. A new approach to microbial production of gallic acid [Journal Article]. 2008;39(4):708–711.
67. Sardi JC, Gullo FP, Freires IA, Pitangui NS, Segalla MP, Fusco-Almeida AM, et al. Synthesis, antifungal activity of caffeic acid derivative esters, and their synergism with fluconazole and nystatin against *Candida* spp [Journal Article]. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;86(4):387–391. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27638348>.
68. Kolaç T, Gürbüz P, Yetiş G. DOĞAL ÜRÜNLERİN FENOLİK İÇERİĞİ VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİ [Journal Article]. *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi.* 2017;5(1), 26-42.
69. Buldak RJ, Hejmo T, Osowski M, Buldak L, Kukla M, Polaniak R, et al. The Impact of Coffee and Its Selected Bioactive Compounds on the Development and Progression of Colorectal Cancer In Vivo and In

- Vitro [Journal Article]. *Molecules*. 2018;23(12). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30551667>.
70. Cilliers JJ, Singleton VL. Caffeic acid autoxidation and the effects of thiols [Journal Article]. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1990;38(9), 1789-1796.
71. Agunloye OM, Oboh G, Ademiluyi AO, Ademosun AO, Akindahunsi AA, Oyagbemi AA, et al. Cardio-protective and antioxidant properties of caffeic acid and chlorogenic acid: Mechanistic role of angiotensin converting enzyme, cholinesterase and arginase activities in cyclosporine induced hypertensive rats [Journal Article]. *Biomedicine Pharmacotherapy*. 2019;109, 450-458.
72. Louvel S, Moodley N, Seibert I, Steenkamp P, Nthambeleni R, Vidal V, et al. Identification of compounds from the plant species *Alepidea amatymbica* active against HIV [Journal Article]. *South African journal of botany*. 2013;86: 9-14.
73. Tewtrakul S, Miyashiro H, Nakamura N, Hattori M, Kawahata T, Otake T, et al. HIV-1 integrase inhibitory substances from *Coleus parvifolius*. [Journal Article]. *Phytotherapy Research*. 2003;17(3), 232-239.
74. Langland J, Jacobs B, Wagner CE, Ruiz G, Cahill TM. Antiviral activity of metal chelates of caffeic acid and similar compounds towards herpes simplex, VSV-Ebola pseudotyped and vaccinia viruses [Journal Article]. *Antiviral Res*. 2018;160:143-150. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30393014>.
75. Melaiye A, Youngs WJ. Silver and its application as an antimicrobial agent [Journal Article]. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2005;15(2):125-130.
76. Nour El Din S, El-Tayeb TA, Abou-Aisha K, El-Azizi M. In vitro and in vivo antimicrobial activity of combined therapy of silver nanoparticles and visible blue light against *Pseudomonas aeruginosa* [Journal Article]. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:1749-58. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27175075>.
77. BAY BN. Nanoteknolojik Dezenfektanların Farklı Fiziksel Ve Kimyasal Koşullarda Etkinliğinin İncelenmesi [Thesis]; 2015.
78. Doğan Z. Nanolif Yara Örtücü Yüzeylerin Geliştirilmesi Ve Karakterizasyonu [PhD Thesis]; 2013.

79. Naik K, Kowshik M. The silver lining: towards the responsible and limited usage of silver [Journal Article]. *J Appl Microbiol.* 2017;123(5):1068–1087. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28650591>.
80. ÇELİK E, Bursalı z, Alagöz GJSTD. Yenidoğan Konjonktivitleri [Journal Article];8(2):176–181.
81. Gallagher JJ, Williams-Bouyer N, Villarreal C, Hegggers JP, Herndon DN. In: Treatment of infection in burns. vol. 136-176. Philadelphia: Elsevier, Inc; 2007. .
82. Privett BJ, Deupree SM, Backlund CJ, Rao KS, Johnson CB, Coneski PN, et al. Synergy of nitric oxide and silver sulfadiazine against gram-negative, gram-positive, and antibiotic-resistant pathogens. [Journal Article]. *Molecular pharmaceutics.* 2010;7(6), 2289-2296.
83. Mirnezami M, Rahimi H, Fakhar HE, Rezaei K. The Role of Topical Estrogen, Phenytoin, and Silver Sulfadiazine in Time to Wound Healing in Rats [Journal Article]. *Ostomy/wound management.* 2018;64(8), 30-34.
84. Jimenez J, Chakraborty I, Rojas-Andrade M, Mascharak PK. Silver complexes of ligands derived from adamantylamines: Water-soluble silver-donating compounds with antibacterial properties. [Journal Article]. *Journal of inorganic biochemistry.* 2017;168, 13-17.
85. Razavi S, Partoazar A, Takzaree N, Fasihi-Ramandi M, Bahador A, Darvishi MH. Silver sulfadiazine nanoethogel for burn healing: characterization and investigation of its in vivo effects. [Journal Article]. *Nanomedicine.* 2018;13(11), 1319-1331.
86. Alastruey-Izquierdo A, Melhem MS, Bonfietti LX, Rodriguez-Tudela JL. Susceptibility Test for Fungi: Clinical and Laboratorial Correlations in Medical Mycology [Journal Article]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015;57 Suppl 19:57–64. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26465371>.
87. J V, KC C, G F, JH J, ML L, DW W. Susceptibility Test Methods: Yeast and Filamentous Fungi. 10th ed. [Journal Article]. *Washington DC: American Society for Microbiology Press.* 2011;p. 2020–2037. Available from: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555816728>.
88. Wayne P. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard. CLSI document M27-A3; 2008.

89. Uğur D. Antimikrobiyal duyarlılık testleri [Journal Article]. *Klinik Dergisi*. 2012;49:107–112.
90. Wayne P. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. CLSI document M44-A; 2004. Available from: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555816728>.
91. Baysal T, Yıldız H. Bitkisel fenoliklerin kullanım olanakları ve insan sağlığı üzerine etkileri [Journal Article]. *Gıda Mühendisliği Dergisi*. 2003;7(14):29–35.
92. Klasen H. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver [Journal Article]. *Burns*. 2000;26(2):131–138.
93. Rangkadilok N, Tongchusak S, Boonhok R, Chaiyaroj SC, Junyaprasert VB, Buajeeb W, et al. In vitro antifungal activities of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract [Journal Article]. *Fitoterapia*. 2012;83(3):545–53. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22245574>.
94. Teodoro GR, Brighenti FL, Delbem ACB, Delbem dCB, Khouri S, Gontijo AVL, et al. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans* [Journal Article]. *Future microbiology*. 2015;10(6):917–927.
95. Barros D, MACTSSHMSBCFIC L. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. [Journal Article]. *Industrial Crops and Products*. 2013;41:41–45.
96. Alves CT, Ferreira IC, Barros L, Silva S, Azeredo J, Henriques M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species [Journal Article]. *Future microbiology*. 2014;9(2):139–146.
97. Gehrke IT, Neto AT, Pedroso M, Mostardeiro CP, Da Cruz IB, Silva UF, et al. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae) [Journal Article]. *Journal of ethnopharmacology*. 2013;148(2):486–491.
98. Liu M, Katerere DR, Gray AI, Seidel V. Phytochemical and antifungal studies on *Terminalia mollis* and *Terminalia brachystemma* [Journal Article]. *Fitoterapia*. 2009;80(6):369–373.
99. Ozcelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids [Journal Article].

- Pharm Biol.* 2011;49(4):396–402. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21391841>.
100. Alves CT, Ferreira IC, Barros L, Silva S, Azeredo J, Henriques M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species [Journal Article]. *Future Microbiology.* 2014;9(2):139–146.
101. De Vita D, Friggeri L, D’Auria FD, Pandolfi F, Piccoli F, Panella S, et al. Activity of caffeic acid derivatives against *Candida albicans* biofilm [Journal Article]. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(6):1502–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24582984>.
102. Cheah HL, Lim V, Sandai D. Inhibitors of the glyoxylate cycle enzyme ICL1 in *Candida albicans* for potential use as antifungal agents [Journal Article]. *PLoS One.* 2014;9(4):e95951. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24781056>.
103. Silva Junior IF, Raimondi M, Zacchino S, Cechinel Filho V, Noldin VF, Rao VS, et al. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid." [Journal Article]. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2010;20.3: 422-428.
104. Hamilton-Miller JM, Shah S, Smith C. Silver sulphadiazine: a comprehensive in vitro reassessment [Journal Article]. *Chemotherapy.* 1993;39(6):405–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8222868>.
105. Wlodkowski T, Rosenkranz H. In: Antifungal activity of silver sulphadiazine. vol. 302.7831; 1973. p. 739–740.
106. Coşkun MV, Ağan c, Uyanık MH, Hancı H, Özden K. Comparison of the E test with the CLSI broth microdilution method for testing fluconazole against *Candida* spp. isolated from blood cultures. [Journal Article]. 2017; Available from: <http://hdl.handle.net/11424/6312>.
107. KuMar D, Bhattacharyya S, Gupta P, Banerjee G, Singh M. Comparative analysis of disc diffusion and E-test with broth micro-dilution for susceptibility testing of clinical *Candida* isolates against amphotericin B, fluconazole, voriconazole and caspofungin [Journal Article]. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR.* 2015;9.11: DC01.

EK A. Etik Kurul Onay Formu

S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU (2013-KAEK-64)
KARAR FORMU

SAYI:

Tarih: 17.05.2018

KONU: Etik Kurulu Kararı

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Elajik Asit, Kafeik Asit ve Gümtüş Sülfodiazin'in Kan Kültüründe İzole Edilen Candida'lar Üzerindeki In-Vitro Etkisinin Flukonazol İle Karşılaştırılması	
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Doktor Erkin Cad. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi
	TELEFON	216 570 91 90
	FAKS	216 565 55 26
	E-POSTA	etik@sbgoztepehastanesi.gov.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Mustafa Samastı		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi		
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI			
	DESTEKLEYİCİ			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TUBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>	
FAZ 4		<input type="checkbox"/>		
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tıbbi cihaz klinik araştırması	<input type="checkbox"/>		
	In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	<input type="checkbox"/>		
	İlaç dışı klinik araştırma	<input checked="" type="checkbox"/>		
	Retrospektif	<input type="checkbox"/>		
	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	Belge Adı			Açıklama		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	İLAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
KARAR BİLGİLERİ	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
	Diğer:	<input type="checkbox"/>				
	Karar No: 2018/0170	Tarih: 17.05.2018				

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Derya Büyükkayhan
İmza:

S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU (2013-KAEK-64)
KARAR FORMU

SAYI:

Tarih: 17.05.2018

KONU: Etik Kurulu Kararı

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Elajik Asit, Kafeik Asit ve Gümüş Sülfodiazin'in Kan Kültüründe İzole Edilen Candida'lar Üzerindeki İn-Vitro Etkisinin Flukonazol İle Karşılaştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki			Katılım *	İmza
			E	K	E	H	E		
Prof. Dr. Derya Büyükkayhan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	T.C. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Aytekin OĞUZ	İç Hastalıkları Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Işıl MARAL	Halk Sağlığı Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Asif Yıldırım	Üroloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Süleyman Daşdağ	Biyofizik	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Asiye KANBAY	Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Şükrü Sadık ÖNER	Tıbbi Farmakoloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sebahat Dilek Torun	Halk Sağlığı	Özel Kuruluş	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sıdika Şeyma ÖZKANLI	Tıbbi Patoloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hacer Hicran Mutlu	Aile Hekimliği	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Avukat Mahmut ÇELİK	Avukat	Çelik Gönen Hukuk Bürosu	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Saliha Şahin	İşçi		E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

*:Toplantıda Bulunma

Karar: Onaylandı Reddedildi

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Derya Büyükkayhan
İmza: