

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

Candida albicans HÜCRE DUVAR FİZYOLOJİSİNİN DEĞİŞİK MONOKLONAL
VE POLİKLONAL ANTİKORLAR İLE ARAŞTIRILMASI VE İMMÜN SİSTEMLE
ETKİLEŞİMLERİNİN GÖSTERİLMESİ

Cevahir ALTINKAYNAK

Danışman Öğretim Üyesi
Prof.Dr. Haluk ATAÖĞLU

Aralık
2014

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Cevahir ALTINKAYNAK



ONAY

Prof.Dr. Haluk ATAÖĞLU danışmanlığında, Cevahir ALTINKAYNAK tarafından hazırlanan bu çalışma 26/12/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. J. ul. de. Sedey Büyümen İmza: 


Üye : Prof. Dr. Alper TEKGÜ İmza: 

Üye : Prof. Dr. Haluk Ataöğlu İmza: 

Üye : Prof. Dr. Aydın Karaarslan İmza: 

Üye : Doç. Dr. Erkan YILMAZ İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.



Prof.Dr. Aykut ÖZKUL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Candida albicans Hücre Duvar Fizyolojisinin Değişik Monoklonal ve Poliklonal Antikorlar ile Araştırılması ve İmmün Sistemle Etkileşimlerinin Gösterilmesi

Cevahir ALTINKAYNAK

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Haluk ATAÖĞLU

Candida albicans insanda hem kommensal hem de fırsatçı patojen olarak bulunabilen polimorfik bir maya mantarıdır. Kandida hücre duvar ana komponentlerinden birisi mannan yapısıdır, bu yapı mantar-konak ilişkisinde ve virülansda çok önemlidir. *C.albicans* enfeksiyonlarının gelişiminde mikroorganizmanın maya formundan hif formuna geçiş yeteneği önemlidir. Hif formu, maya formunda olmayan çeşitli antijenik özelliklere sahiptir. Maya hif yapığında hücre duvarında yapısal değişiklik meydana gelir ve bu geçiş ile ilgili yeterli bilgi mevcut değildir. Bu çalışmanın amacı; *C.albicans*' ın form değiştirdiğinde hücre duvar yapısında yer alan mannanın konfigürasyon değişiminin ve ifadesinin monoklonal ve poliklonal antikorlar kullanılarak araştırılması ve bunların immün sistem üzerine olan etkilerinin ortaya konulmasıdır.

Yapılan çalışmalar ve bulguların değerlendirilmesi sonucunda, *C.albicans* maya hücre duvarına karşı özgüllüğü yüksek IgM sınıfından 2B7 monoklonal antikor (mAb) elde edildi. Bu antikor benzer hücre duvar yapısına sahip bakterilerden *Salmonella choleraesuis* (211) ve *Salmonella infantis* suşları ile çapraz reaksiyon verdi. ACMK-1(Matriks Biotek®, Ankara, Türkiye) mAb' u ile *C.albicans* maya formu yüzeyinde bulunan mannan β -1,2 bağının varlığı doğrulandı. Bunun yanında ACMK-1 mAb' u, *C.albicans* maya formu ile floresans verirken hif yapısı ile ışığa vermedi. İlk defa elde edilen bu veri ile maya hif duvarında β -1,2 mannan bağlarının ya seyrek olarak bulunduğu ya da hiç bulunmadığı bu çalışma ile gösterildi. ACMK-1 ve 2B7 mAb' ları mannanı tanımlamasına rağmen, epitop özellikleri farklı olduğundan 2B7 mAb' u *S.choleraesuis* (211) ile reaksiyon verirken ACMK-1 mAb' u aynı bakteri ile reaksiyon vermedi. *C.albicans* ile immün sistem arasındaki ilişki araştırılırken; doğuştan kazanılmış bağışıklık sisteminin çok iyi korunan molekülü olan alfa-2 makroglobulin(A2M)' e özgül monoklonal antikor A2M10 ve poliklonal antikorlar elde edildi. Bu elde edilen mAb kandida ile reaksiyon verirken 2B7 mAb'u da insan A2M proteini ile reaksiyon verdi. Böylece kandida ve A2M mannoz yapısı arasında çapraz reaksiyon olduğu da ilk defa bu çalışmada gösterildi.

Sonuç olarak, *Candida türleri* ile doğada ve insan florasında sürekli ilişki içerisinde bulunmamız nedeniyle bu mikroorganizmanın antijenik yapılarının tanımlanması ve bunların immün sistem üzerine olan etkilerinin ortaya konulması son derece önemlidir. Patojenite mekanizmaları aydınlatılırsa yeni anti-fungal ilaçların ve immünoterapötik yöntemlerin geliştirilmesi kaçınılmazdır.

2014, 89 sayfa

Anahtar kelimeler: *Candida albicans*, mannan, kandida enfeksiyonları, hif form, maya form, monoklonal antikor, poliklonal antikor, virülans.

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

Investigation Of The Cell-Wall Components Of *Candida albicans* By Using Different Monoclonal and Polyclonal Antibodies and Demonstration Of Their Interaction With The Immune System

Cevahir ALTINKAYNAK

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Haluk ATAÖĞLU

Candida albicans is a polymorphic fungus that may be present in both commensal and opportunistic pathogen in humans. One of the main components of the *Candida* cell wall is mannan structure. The ability to switch from yeast to hyphae form of microorganism is very important in development of *C.albicans* infection. Hyphal form has several antigenic properties not found in yeast form. The structural changes occur in the yeast cell wall in a transition from the yeast form to the hyphal form and there are currently not enough information about this transition. The aim of this thesis is to investigate the configuration alter and expression of mannan structure which is present in cell-wall components of *C.albicans* by using monoclonal and polyclonal antibodies and to identificate of their interaction with the immune system in a transition from the yeast form to hyphal form.

According to the evaluation of studies and findings; the high specific murine monoclonal antibody (Clone 2B7) class IgM against to *C.albicans* cell wall was obtained. 2B7 mAb cross-reacted with *Salmonella choleraesuis* (211) and *Salmonella infantis* bacteria which cell wall structure are similar to the *C.albicans*. The existance of mannan β -1,2 bonds on the surface of *C.albicans* yeast form was confirmed with ACMK-1 mAb. Besides that, ACMK-1 mAb gave high positive result with *C.albicans* yeast form but also did not give with hyphal form to fluorescence detection. The mannan β -1,2 bonds are found either little or nothing on the fungal hyphal wall was obtained for the first time with this study. Although ACMK-1 and 2B7 mAb define mannan structure, 2B7 mAb reacted with *S.choleraesuis* (211), however ACMK-1 mAb did not react with the similar microorganism due to the different epitope specificity between ACMK-1 and 2B7. While investigating the relationship between *C.albicans* and the immune system, the high specific monoclonal antibody (Clone A2M10) against to A2M which is very well protected molecule of innate immune system and polyclonal antibodies were obtained. This obtained antibody reacted with *Candida*, however 2B7 mAb reacted also with human protein A2M. Thus, this data that is cross-reacted between *Candida* and A2M mannose structures was shown in this study for the first time.

Consequently, to identification of antigenic structures of this microorganism because of we always contact with *Candida* species and to present their effects on the immune system are extremely important. If the mechanisms of pathogenicity are illuminated, the development of new anti fungal drugs and immunotherapeutic procedures are inevitable.

2014, 89 pages

Keywords: *Candida albicans*, mannan, *Candida* infections, hyphal form, yeast form, monoclonal antibody, polyclonal antibody, virulance.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana her türlü çalışma olanağını sağlayarak bilimsel olarak kattığı yardımların dışında, hayatımda çok önemli bir yeri olan ve fikirlerine her zaman ihtiyaç duyacağım saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. Haluk ATAÖĞLU' na; bana her zaman göstermiş olduğu anlayış, hoşgörü ve desteğinden ötürü teşekkürlerimi sunuyorum.

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı' nda bulunduğum süre içinde birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım sevgili arkadaşlarım Didem MOLLA ve Burcu YENER İLÇE' ye,

Eğitimim süresince sonsuz ve koşulsuz sevgilerini esirgemeyen sevgili kardeşlerim Kürşad, Seyfettin ve Oğuzhan ALTINKAYNAK' a,

Bu günlere gelmem konusunda maddi-manevi her türlü desteği sağlayan, her aşamayı benimle beraber atlatan, hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim sevgili annem Fatma ALTINKAYNAK' a ve sevgili babam Osman ALTINKAYNAK' a, sonsuz teşekkür, şükran ve minnetlerimi sunuyorum. Her gün bana huzur, mutluluk ve yaşama sevinci veren sevgi ve şefkat dolu sesiniz olmasaydı ne yapardım bilemiyorum.

Cevahir ALTINKAYNAK

Ankara, 2014

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	I
ONAY	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
SİMGELER DİZİNİ	X
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Mantarlar Genel Bilgi	3
2.2. Kandidaların Genel Özellikleri ve Morfolojisi	4
2.3. <i>Candida albicans</i> Hücre Duvar Yapısı	5
2.4. Kandidaların Klinik Önemi	9
2.5. Kandida Enfeksiyonlarının Virülans ve Patojenitesi	10
2.6. <i>Kandida Türlerinin</i> İmmün Sistemle Etkileşimi	11
3. GEREKÇE VE AMAC	17
4. MATERYAL VE YÖNTEM	18
4.1. Materyaller	18
4.1.1. Mantarlar ve bakteriler	18
4.1.2. Hücre suşu	18
4.1.3. Primer kültür	18
4.1.4. Besiyerleri	18
4.1.5. Deney hayvanı	18
4.1.6. Cihazlar	19
4.1.7. Sarf malzemeleri	20
4.1.8. Kimyasal malzemeler	21
4.2. Yöntemler	24
4.2.1. Mantar ve bakteri suşlarının hazırlanması	24
4.2.2. Hücrelerin hazırlanması ve depolanması	24
4.2.3. Hücre duvar antijenlerinin eldesi	25
4.2.4. β -Eliminasyon	25
4.2.5. Kandida alkalin ekstraksiyonu	26
4.2.6. Karbonhidrat ve protein tayinleri	26

4.2.7. Alfa-2 makroglobulin eldesi ve saflaştırılması.....	27
4.2.8. Monoklonal ve poliklonal antikor üretimi	29
4.2.9. Hibridoma antikorlarının saflaştırılması ve tuzların uzaklaştırılması.....	32
4.2.10. ELISA testi	32
4.2.11. İmmünfloresans ile boyama testi	33
4.2.12. Denatüre ve Denatüre edici olmayan poliakrilamid jel elektroforezi.....	34
4.2.13. Western-Blot analizi	35
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>37</u>
5.1. Anti-<i>C.albicans</i> Monoklonal Antikor Eldesi:	37
5.2. Anti-<i>C.albicans</i> Monoklonal Antikorumun Fonksiyonelliğinin Gösterilmesi:..	38
5.3. 2B7 Antikorumun <i>C.albicans</i> N-Glikolizasyonla Bağlı Mannan ile Testi:	39
5.4. 2B7 Monoklonal Antikorumun Benzer Yapıdaki Bakteriler ile Testi:.....	40
5.5. ACMK-1 mAb' unun <i>C.albicans</i> maya ve hif formu ile testi:	40
5.6. ACMK-1 antikorumun <i>Salmonella choleraesuis</i> (211) ile testi:	43
5.7. Plazmadan Elde Edilen A2M' in Elektroforez ile Doğrulanması:	43
5.8. Anti-Alfa-2 Makroglobulin Poliklonal ve Monoklonal Antikor Eldesi:	44
5.9. mAb 2B7' nin Serum Proteinlerinden A2M ile Testi:	45
5.10. mAb A2M10' nin <i>C.albicans</i> Maya Formu ile Testi:.....	46
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ</u>	<u>47</u>
<u>KAYNAKLAR</u>	<u>52</u>
<u>EKLER</u>	<u>59</u>
EK1: Etik Kurul Kararı.....	59
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>61</u>
<u>TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR.....</u>	<u>66</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Candida albicans</i> hücre duvar katmanları ve yapısı	6
Şekil 2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mannan hücre duvar yapısı.....	7
Şekil 2.3. <i>Candida albicans</i> mannan hücre duvar yapısı	7
Şekil 4.1. Biorad' ın Biologic Duoflow kromatografi sistemi	28
Şekil 4.2. A2M' nin Biologic Duoflow kromatografisi ile saflaştırılması	29
Şekil 4.3. Blot içerisindeki yerleşim planı.....	35
Şekil 5.1. Bağışıklanan farelerde ELISA ile ölçülen antikor titresi sonuçları.....	37
Şekil 5.2. Klon tarama ELISA testleri sonucu pozitif yanıt veren hücre hatları	38
Şekil 5.3. <i>C.albicans</i> maya formu faz kontrast mikroskopi görüntüsü. Primer: Klon 2B7 süpernatantı	39
Şekil 5.4. <i>C.albicans</i> maya formu immünfloresans görüntüsü. Primer: Klon 2B7 süpernatantı	39
Şekil 5.5. <i>C.albicans</i> maya formu faz kontrast mikroskopi görüntüsü. Primer: ACMK-1 antikor.....	41
Şekil 5.6. <i>C.albicans</i> maya formu immünfloresans görüntüsü. Primer: ACMK-1 antikor.....	42
Şekil 5.7. <i>C.albicans</i> hif formu faz kontrast mikroskopi görüntüsü. Primer: ACMK-1 antikor.....	42
Şekil 5.8. <i>C.albicans</i> hif formu immünfloresans görüntüsü. Primer: ACMK-1 antikor	43
Şekil 5.9. Alfa-2 makroglobulinin denatüre edici olmayan (A) ve denatüre (B) % 5-20 gradient jel elektroforez görüntüsü	44
Şekil 5.10. A2M proteini, % 5-20 SDS-PAGE jel görüntüsü.	44
Şekil 5.11. Alfa-2 makroglobulin antikor yanıtları	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Karbonhidrat tayini için standartların hazırlanması	26
Çizelge 4.2. İmmünizasyon protokolü.....	30
Çizelge 4.3. % 5-20' lik gradient jel hesabı	34
Çizelge 5.1. 2B7 antikoruna ile <i>C.albicans</i> N-glikolizasyonla bağlı mannan ile ELISA testi sonucu	40
Çizelge 5.2. 2B7 monoklonalının <i>S.choleraesuis</i> (211) ve <i>S.infantis</i> ile ELISA testi sonuçları	40
Çizelge 5.3. <i>C.albicans</i> maya formu ve CAE ile ACMK-1 antikorunun ELISA testi sonuçları	41
Çizelge 5.4. <i>C.albicans</i> maya formu ve <i>S.choleraesuis</i> (211) ile ACMK-1 antikorunun ELISA testi sonuçları	43
Çizelge 5.5. 2B7 antikorunun A2M ile ELISA testi sonucu	45
Çizelge 5.6. A2M10 antikoruna ile <i>C.albicans</i> mannan ve CAE ile ELISA testi sonuçları	46

SİMGELER DİZİNİ

A2M	Alfa-2 makroglobulin
bFGF	Basic fibroblast growth factor
b-NGF	Beta-Nerve Growth Factor
<i>C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
dk	Dakika
DH	Dentritik hücre
AIDS	Edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
g	Gram
HPLC	High-performance liquid chromatography
IF	İmmünfloresan
IL	İnterlökin
Ca ⁺²	Kalsiyum
CO ₂	Karbondioksit
CAE	Kandida alkalın ekstraktı
kDa	Kilodalton
LRP	Low-density lipoprotein receptor related protein
LB	Lysogeny broth
Mg ⁺²	Magnezyum
YEPD	Maya özütü peptonlu dekstroz
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NO	Nitrik Oksit
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGF-BB	Platelet-derived growth factor-Homodimer
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
°C	Santigrat derece

SDS	Sodyum dodesil sülfat
NaOH	Sodyum hidroksit
TGF- β	Transforming growth factor beta
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
TGF- β 2	Transforming growth factor beta 2
TCA	Triklorasetik asit
TLR	Toll like reseptör
TNF- α	Tümör nekrozis faktör-alpha
Th/Th1	Yardımcı T hücreleri/ Yardımcı T hücreleri 1

1 GİRİŞ

Candida albicans insanda hem kommensal hem de patojen olarak bulunabilen polimorfik bir maya mantarıdır. Maya hücresinin plazma zarı dışına yerleşmiş olan hücre duvarı, mantar-konak ilişkisinde önemli rol oynar ve mayanın tutunmasından sorumludur. Maya hif yaptığında hücre duvarında değişiklik meydana gelir (1). Hücre duvarında yer alan proteinlerin yapısı değişir ve hif formunda damar endoteline bağlanma özelliği kazanır. Patojenite ve virülans ile ilgili biyolojik fonksiyonların birçoğu hücre duvarının kimyaca yapısı, bileşikleri ve yapışmada rol oynayan özel bileşikleri ile ilgilidir. *Candida albicans*, maya ve hif formu arasında geçiş yapabilme yeteneğine sahiptir (2). Bu morfolojik değişim çeşitli koşullara bağlı olarak sırası ile maya, germ tüpü, yalancı hif ve/veya gerçek hif oluşumunu kapsamaktadır (3). Sıcaklık, pH ve besiyeri gibi ortam koşulları gelişecek fenotipi belirlemektedir. *C.albicans*, normal florada maya mantarı şeklinde iken doku invazyonu sırasında genellikle hif formundadır. 37°C’ de serumda veya RPMI içerisinde 3-4 saatte germ tüp oluşturur ve hif formuna dönerler (3). Hif formu maya formunda olmayan çeşitli antijenik özelliklere sahiptir.

C.albicans, hücre duvarının immünojenik olan ana bileşimi mannan yapısıdır. Mannozy birimleri bu yapıya α -1,6, α -1,2, α -1,3 ve β -1,2 bağlarıyla bağlanarak yan zincirler oluştururlar (4). N-bağı ile bağlı mannan yapısı türe özgü iken, O-bağı ile bağlı yapı cins içerisinde ortaktır (5). Mannan bir D-mannozy homopolimeridir (6). Mannan ekstraktları değişik miktarlarda fosfat ve protein içerirler. Mannan serolojik yanıt oluşturan en önemli kandida antijenidir ve lenfositleri indükleyip bağışıklık yanıtı vererek özgül antikor oluşturabilir (7).

C.albicans, konakçı ile kommensal bir ilişki içerisinde ve çoğunlukla gastrointestinal sistemde yer almaktadır (8). Ancak uygun şartlar geliştiğinde; örneğin transplantasyon sonrası, uzun süren antibiyotik tedavileri, kanser kemoterapisi, immün sistemin zayıf düştüğü durumlar, immün sistemin baskılandığı hastalık tedavileri, sitotoksik terapiler, intravenöz kateterlerin varlığı, diyabet, nötropeni, çok düşük kiloda doğum ve AIDS geliştiği zaman invazyon yeteneğiyle ciddi enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Kandida

enfeksiyonlarına karşı hem hücresel hem de hümoral immün yanıt oluşmaktadır, özellikle makrofaj, granülosit kökenli hücreler ve nötrofiller letal kandida enfeksiyonlarına karşı immün yanıtta önemlidir. Bu tür maya mantarlarının neden olduğu kandidemide erken tanı ve tedavi önemlidir. Bağışıklığı baskılanmış hastalarda sorun oluşturan fırsatçı enfeksiyon olan sistemik kandidiyazisin önlenmesinde ve tedavisinde kullanımda olan antifungallere karşı direnç gelişimi sebebiyle yeni ilaçlara ihtiyaç vardır (4,8). Uygun olmayan tanı ve tedavi ile birlikte morbidite ve mortalite artmakta ve ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Mevcut tanı yöntemleriyle erken tanı her zaman kolay olmamaktadır.

C. albicans maya formundan hif formuna geçiş ile ilgili yeterli bilgi mevcut değildir. Bu iki form arasındaki farklılıkların aydınlatılması kandidanın patojenite mekanizmalarını anlamada bir gerekliliktir. Kandidanın antijenik yapılarının tanımlanması ve bunların immün sistem üzerine olan etkilerinin ortaya konulması, yeni antifungal ilaçların ve immünoterapötik prosedürlerin geliştirilmesi için zorunludur. Bu mikroorganizma ile sürekli temas halinde bulunmamız nedeniyle bu bulgular önemlidir.

2 KURAMSAL TEMELLER

2.1 Mantarlar Genel Bilgi

Mantarlar; ökaryotik, tek hücreli ya da çok hücreli olabilen ve oluşturdukları klinik enfeksiyon tablolarına göre farklı başlıklar altında incelenebilen mikroorganizmalardır. Doğada 250,000 mantar türü tanımlanmasına rağmen bunlardan 500' e yakını insanlar için primer patojendir. Mantarlarda, mayozlu çekirdek bölünmesi vardır. Morfolojik yapılarına göre mantarlar küf ve maya olmak üzere iki grupta incelenir (9, 10, 11).

Küf Mantarları: *Aspergillus* türleri, *Fusarium* türleri, *Penicillium* türleri

Maya Mantarları: *Candida* türleri, *Trichosporon* türleri, *Blastoschizomyces capitatus*, neoformans dışı *Cryptococcus* türleri, *Malassezia* türleri, *Saccharomyces* türleri (12).

Küfün temel yapı birimi hif olarak tanımlanmış tüpümsü yapılardır. Bunlar kalın tüp şeklinde hücre uzantılarıdır. Hif topluluğuna miçel denir (9). Mayalar ise tek hücreli tomurcuklanarak üreyen genellikle yuvarlak veya oval şekilde mikroorganizmalardır (1). Germ tüp, blastospor, klamidospore, artrospor ve kapsül gibi yapılar oluştururlar (11). Çapları 2-20 µm, boyları 2-50 µm arasında değişir. In vivo/in vitro üreme hızını etkileyen başlıca etmenler oksijen, sıcaklık, pH, besiyeri bileşimi gibi faktörlerdir. Patojenite için ise en kritik ölçütlerden bir tanesi serum veya makrofaj tarafından miçel formunun artışıdır (1). İmmüsupresiflerde en sık ve en önemli fungal patojenlerin mayalar olduğu; bunlar arasında da en sık kandidalara rastlandığı bilinmektedir (1,13,14). Hastane kaynaklı dolaşım sistemi enfeksiyonları arasında kandidemi insidansının artmış ve kandidaların en sık saptanan dördüncü etken olduğu belirtilmektedir (15,16,17,18). Antifungal tedavi seçenekleri artmasına rağmen, hastane kaynaklı kandidemili hastalarda mortalite oranları % 50' nin üzerindedir (19,20). Kandidemide erken tanı ve tedavi önemlidir. Uygun olmayan tanı ve tedavi morbidite ve mortaliteyi artırmakta, ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır (21).

2.2 Kandidaların Genel Özellikleri ve Morfolojisi

Candida türleri doğada yaygın olarak bulunan ve insanların normal florasında bulunan maya mantarlarıdır (1,14,22). Kandidalar insan vücudunun, barsak lümeni, deri, ağız ve vajen mukozasında normal flora üyesi olarak bulunurlar (23). Temelde konakçının doğasına zarar vererek çeşitli enfeksiyonlara sebep olurlar. Bundan dolayı, *C.albicans* enfeksiyonları sağlıklı bireylerde çok sık görülmez (1). Kandidalar fırsatçı patojendirler. (24). Tüm diğer fırsatçı patojenler gibi çevresel ve bireysel koşulların organizma aleyhine geliştiği durumlarda hafif yüzeysel enfeksiyonlardan, ağır sistemik enfeksiyonlara kadar çeşitli klinik tablolara yol açabilirler. Floralı bölgelerde fizyolojik koşulların değişmesi (örneğin deride aşırı terleme, vajende pH değişiklikleri vb.), hormonal denge bozukluğu, kortikosteroidler gibi immün sistemi baskılayıcı ilaçların kullanımı, kanser veya AIDS gibi immün yetmezliğe yol açan hastalıklar kandida enfeksiyonlarının gelişimini kolaylaştırır (10,25).

C.albicans, polimorfizm gösteren ve gram boyası ile pozitif boyanan bir mantardır (24). Maya hücreleri blastospor, klamidospore, psödohif ve gerçek hif oluşturma yeteneğindedir. Normal florada maya mantarı şeklinde bulunurlar, buna Y fazı, “yeast phase” denir (24), doku invazyonu sırasında ise hif formunda görülürler. 37 °C’ de serum içerisinde 2-3 saatte germ tüp oluşturur ve hif formuna dönerler (26). Germ tüp oluşumu faz kontrast mikroskopu ile 40X büyütmede rahatlıkla incelenebilir. Germ tüp formu maya hücresinde olmayan çeşitli antijenik özelliklere sahiptir (3) ve hif formu maya formuna göre, dokuya 50 kat daha fazla yapışır (27). *C.albicans*’ ın germ tüp oluşumu döneminde hücre yüzey hidrofobitesi değişir böylece plastik yüzeylere ve epitelyuma bağlanma yeteneği artar (28). Hif formu maya formuna göre fagositoza daha çok direnç gösterir (25). Kandidalar konağa girmeden önce maya fazındadır. Maya formu enfekte dokuda çoğalabilmek, hifal formu ise immün sistem hücrelerini işgal etmek için kullanılır (29).

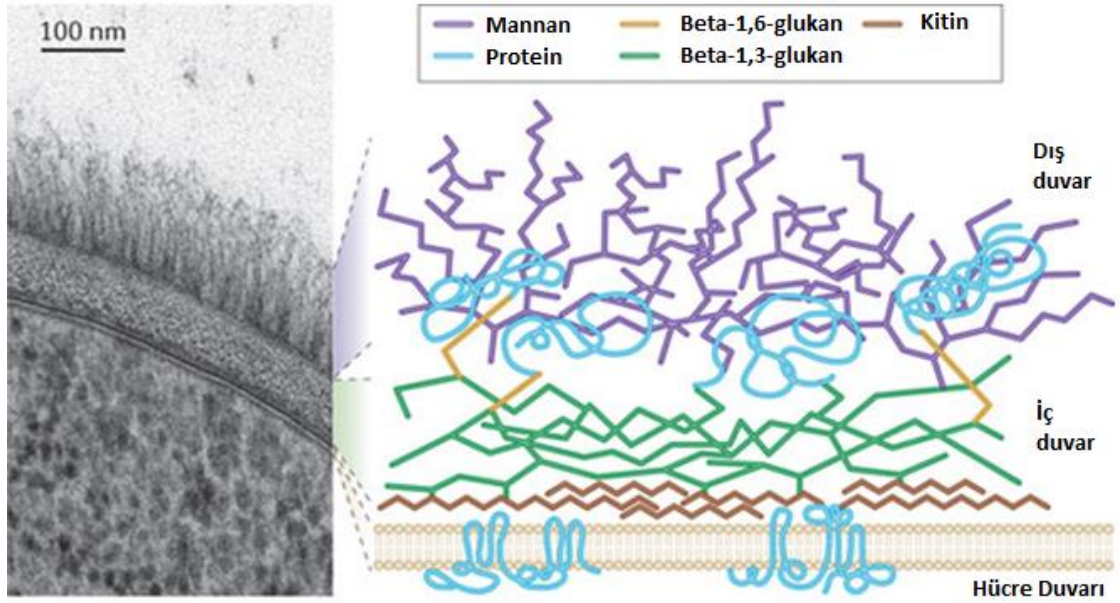
Klinik örneklerde ve kültürlerde *C.albicans* 4-6 µm büyüklüğünde oval veya yuvarlağımsı, tomurcuklanan hücreler (blastokonidyum veya blastosporlar) olarak görülürler. Kültür ortamında ise üreme karakteristikleri ile kandida türleri birbirinden

ayırt edilemez. Poliklonal antiserumlarla *C.albicans*' in hücre duvarında bulunan mannanın yapısal farklılıklarına göre A ve B olmak üzere iki serotipi saptanmıştır. Mannan yapısı serotiplerin ortaya çıkarılmasında önemlidir (30). Klinik kökenler arasında ise serotip A, serotip B' den daha fazladır (31). Hücre duvar mannan yapısını tanımlamada kullanılan farklı kitler piyasada mevcuttur. Kandidanın farklı suşları bu kit (Örneğin *Candida* Check; Iatron Laboratories, Tokyo, Japan) serumları ile test edildiğinde kandida serotip A dört karakteristik 1, 4, 5 ve 6 antijenik faktör serumu ile reaksiyon verir, kandida serotip B ise antijenik faktör 1, 4, 5 ve 13b ile reaksiyon verir. Faktör 6 ile serotip B reaksiyon vermez. (5). Yani *C.albicans* serotip A ve B arasındaki farklılık kullanılan faktör 6 antijenik determinantı ile tespit edilebilir.

2.3 *Candida albicans* Hücre Duvar Yapısı

Mantarlar; plazma zarının dışına yerleşmiş, hücreyi osmoz değişikliklerine karşı koruyan, besin alımında rol oynayan ve ortam ile mantar arasındaki ilişkileri düzenleyen bir hücre duvarı içerirler (31). Hücre duvarı mantar hücresinin biçimini, morfogenezi, virülansını, antijenleri yani mantar-konak etkileşimini ve mantarın antifungallere duyarlılığını belirleyen dinamik çok tabakalı bir yapıdır (32). Hücre duvarının kalınlığı elektron yoğunluklarına göre dağılmış birçok katmandan oluşmaktadır. Katmanların sayısı ve morfolojileri değişken olup, üreme dönemi, üreme şekli, suş ve üreme ortamına göre farklılıklar göstermektedir.

C.albicans' in hücre duvarı, hücrenin toplam ağırlığının yaklaşık % 30' u kadardır. Hücre duvarı % 20-30 mannoprotein, % 25-35 β -1,3 bağlı glukan, % 35-45 β -1,6 bağlı glukan, % 0.6-2.7 kitin, % 5-15 protein ve % 2-5 lipitten oluşmaktadır. En dış tabaka mannoprotein yapıda olup aynı zamanda duvarın iç kısımlarında da bulunur (30). Hücrede yapılan mannoproteinler üreme ortamı ve hücre yaşına göre değişkenlik göstermektedir. *C.albicans* duvar katmanlarının kimyasal komponentleri çeşitli ayırıcılar, kimyasal boyalar, konjuge antikorlar ve konjuge lektinler ile ortaya konulmuştur (30,33). *C.albicans* hücre duvarı en az 5 mannan katmandan oluşmaktadır. Dış katman oluşturulurken ilk kitin fibrilleri sentezlenmekte sonra glukan ve mannoprotein ilave edilmektedir (Şekil 2.1.) (34).



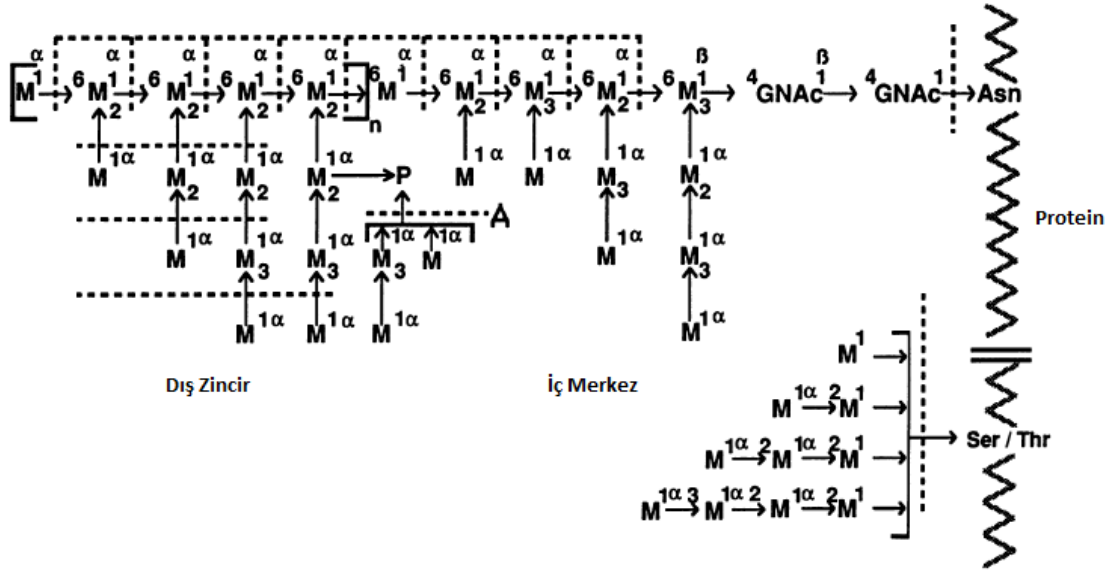
Şekil 2.1. *Candida albicans* hücre duvar katmanları ve yapısı

(Neil A. R. Gow ve arkadaşlarından alınarak uyarlanmıştır, 2012)(14)

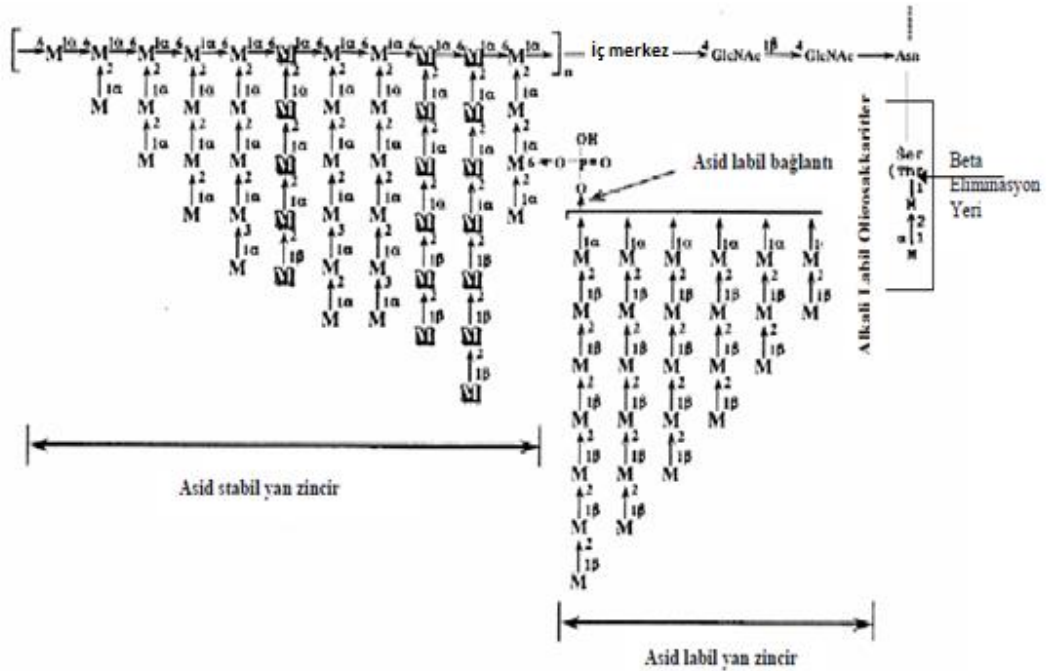
Glukan ve kitin gibi yapısal polimerler plazma membranında sentezlenir, birbirleri ile birleşerek duvara sertlik sağlayan bir yapı oluştururlar. Oysa mannoproteinler endoplazmik retikulumda sentezlendikten sonra golgi kompleksi ve sekretuar veziküller yolunu takip ederek plazma membranının dışına salınırlar. Hücre duvarı salgılanan mannoproteinler için bir süzgeçtir. İntegral duvar mannoproteinlerinin duvar yapısından serbestleşmesi için glukan ve kitin bağlantıları zimoliaz ve kitinaz ile kopartılır. *C.albicans*' tan 4 ana yüksek moleküler ağırlıklı mannoprotein elde edilir; bunlar sırası ile 200, 340, 500 ve 650 kDa ağırlığındadır (35). Mannoz polimerleri, yapısal polimerler olan β -glukanlar ve kitinin içine gömüldüğü hücre duvarının amorf matriksini oluşturur (32).

C.albicans' in mannoproteinleri ile diğer maya mantarlarından biri olan *Saccharomyces cerevisiae*' de bulunan mannoproteinler yapısal olarak benzerdirler (Şekil 2.2. ve Şekil 2.3.) (34). Her iki mayada da mannan, hücre duvarına N- ve O- bağları ile bağlıdır. N-bağı, endo- β -N-asetilglukozaminidaz H gibi glikozidazlara duyarlı, kitobioz ve asparajin (Asn) kalıntısı arasındadır. O-bağları ise hafif alkaliye duyarlı bir mannoz molekülüdür ve peptid zinciri olan serin (Ser) ve threonin (Thr) kalıntıları arasında yer alır (30,36,37). N-bağı ile bağlı mannan yapı türe özgü iken, O-bağı ile bağlı mannan yapısı

genus içerisinde ortaktır. Temel olarak mannopiranozid üniteleri değişik bağlar ile birbirine bağlanarak dallanan yapılar oluşturmaktadır (5,38). Her iki mikroorganizma arasındaki temel fark *Candida* daha fosforiledir ve daha uzun yan zincirlere sahiptir (5).



Şekil 2.2. *Saccharomyces cerevisiae* mannan hücre duvar yapısı



Şekil 2.3. *Candida albicans* mannan hücre duvar yapısı
(Martinez ve arkadaşlarından alınarak uyarlanmıştır, 1998)(32)

Polimorfik maya olan *C. albicans* serotip A' nın hücre duvar mannan yapısı HPLC ve ardışık NMR deneyleriyle tespit edilmiştir. β -1,2 bağlı mannoz kalıntılarını içeren

serotip A' nın, α -1,3 bağılı mannoz üniteleri ve α -1,6 bağılı dallanmış mannoz kalıntılarında olduğu gösterilmiştir (8). β -1,2 bağı; *Saccharomyces cerevisiae* ' de ise yer almamaktadır (5).

Mannoproteininin esas yapısı proteine kitobiyoz köprüsü ve asparajin ile bir omurga üzerinde dallanmış polimannozdur. Yüksek oranda saf hücre duvar mannoprotein fraksiyonunun, 0,1 M NaOH ile ekstraksiyonu (β eliminasyon) ve bunu takiben fraksiyonun anyon değişim kolonundan geçirilmesi ile mannobiyoz, mannotrioz ve mannotetrozlar izole edilir. Mannan kalitatif ve kantitatif olarak *C.albicans* hücre duvarının ana komponentidir ve primer fizyopatolojik önemi vardır (26,34,7). Tomurcuklanan maya hücrelerindeki mannan hif hücrelerinden daha fazladır (31). Mannan birkaç fosfat grubu ile birlikte α -1,2, α -1,3, α -1,6 ve β -1,2 bağılı mannopiranoz ünitelerinden oluşur (39,4). β -1,2 bağılı mannoz üniteleri çok güçlü antijenik bir yapı olan oligomannozil yan zincirini içermektedir (4). β -1,2 bağılı manooligosakkaritler mannan yan zincirine bir fosfat grubu aracılığıyla bağılıdır (4). β -1,2 bağılı manooligosakkarit kısım memelilerde humoral antikor yanıtında α -bağılı manooligosakkaritlere göre daha antijenik rol oynar. β -1,2 bağılı antijenik epitopu faktör 5' e karşılık gelmektedir (5,4). Yani faktör 5 serumu β -1,2 bağılılarıyla reaksiyon vermektedir. α -1,6 bağı ise faktör 6' dan farklı antijenite göstererek faktör 9 serumuna karşılık gelmektedir (5,4).

Candida serotip B' de β -1,2 bağılı mannoz üniteleri sadece fosfat bağına bağılı oligosakkarit kısmında vardır, serotip A' da ise bütün dallanmalarda β -1,2 bağı vardır (4). Hücre duvarının varlığı, maya hücrelerini diğer yüksek hücrelerden ayırt eden bir özelliktir. *C.albicans*' in hücre duvarı antijenik olarak sabit değildir. Dinamik bir yapıya sahiptir, in vitro ve in vivo büyüme koşullarına göre antijenik çeşitlilik gösterir (34). *C.albicans*' ta mannan dışında başka antijenler de saptanmıştır; bunlar arasında önemli olanları salgısal proteazlar, enolaz ve ısı şok proteinleri gibi yapılardır (26).

Kandida mannanının tam kimyasal yapısının açıklanması patojenite mekanizmalarını anlamada ve yeni antifungal ilaçların ve immünoterapötik yöntemlerin geliştirilmesi için zorunludur (4). Seroloji çalışmalarının çoğu tüm mannan kompleksini antijen

preperasyonu olarak kullanmakta, farklı antikorlarla tek tek epitoplari tanımlamamaktadır. Serolojik özgüllükle olduğu düşünölen hücre duvarında bulunan epitoplari belirlemek için özgül mannanın kimya yapısını belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır (32,34). Yapılan bir çalışmada, koruyucu olan, koruyucu olmayan ve enfeksiyonu artırıcı bağışık serumlar bulunmuş, kandidaya antikor yanıtının karmaşık ve belki izotipe ve epitopa özgül olduğu öne sürölmüşdür (40). Ancak epitop bazında açıklanmamış olan maya ve hif form arasındaki farklılıkların tespit edilmesiyle neoantijenik bir determinantın var olup olmadığının açıklığa kavuşturulması gerekmektedir.

2.4 Kandidaların Klinik Önemi

Kandida türleri içerisinde *C.albicans*, enfeksiyonların çoğundan sorumludur ve tüm dolaşım sistemi enfeksiyonları arasında en yüksek mortaliteye sahiptir. Yoğun bakım ünitelerinde fungal enfeksiyonların mortalitelerinin yüksek olmasının çeşitli nedenleri vardır. Bunlar hastaların ağır hastalık tablosu içinde olmaları, eşlik eden çok sayıda komorbidite faktörlerinin olması, erken tanıda güçlükler, hastanede yatış süresinin uzun olması, antifungal ilaçların immünsüpresif ilaçlar ile etkileşimi ve antifungal profilaksi konusunun net olmayışdır. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzun süre kullanılması ise kandidaların gastrointestinal kolonizasyonunu artırır (10).

Fungal enfeksiyonlar, enfeksiyonun bölgesine göre sınıflandırılabilirler;

- 1- Yüzeysel mantar enfeksiyonları; enfeksiyon deri, tırnaklar ve mukoz membranlar ile sınırlıdır. Bu hastalıklar dünya üzerinde milyonlarca kişiyi etkilemektedir ve tedaviye yanıtları iyidir.
- 2- Subkütanöz mantar enfeksiyonları
- 3- Sistemik (invazif) mantar enfeksiyonları

Kandidiyazisli hastalarda *C.albicans* derin dokuları istila eder ve yaşamı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara neden olur (8). Kandidiyazisle ilgili olarak yüksek morbidite ve

mortaliteye rağmen bu enfeksiyonun insidansında bir azalma görülmemektedir. Çünkü sistemik kandidiyazisin klinik ve mikrobiyolojik tanısı zordur (41).

2.5 Kandida Enfeksiyonlarının Virülans ve Patojenitesi

Patojenite ve virülans ile ilgili biyolojik fonksiyonların birçoğu hücre duvarında yerleşiktir. *Kandida türlerinin* hücre duvar mannoprotein yapısı konak-mantar ilişkisinde ve virülansında çok önemlidir (4). Kandida enfeksiyonlarının gelişiminde konak savunma mekanizmaları ve mikroorganizmanın virülansı rol oynar. Sağlam deri ve mukozaların kandida enfeksiyonlarının gelişimini önlemede rolü büyüktür. Deri maserasyonuna neden olan her türlü olay, sağlıklı kişilerde de duyarlı bölgelerde kandida invazyonuna izin verir. Kandidalar dermise veya kan dolaşımına geçtiğinde polimorfonükleer lökositler savunmaya katılır. Nötrofillerden başka monosit ve eozinofiller fagositozda yer alır. Doku makrofajlarının ve yerleşik retikuloendotelial hücrelerin de kandidaları öldürme kapasiteleri vardır. Kandidalar herhangi bir nedenle buldukları ortamda koşulları değiştirerek miktarları artarsa veya florasız bir bölgeye geçerlerse, fırsatçı kandida enfeksiyonlarına yol açabilirler. Özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda mikroorganizmanın biyofilm oluşturması ve biyomateryal yüzeylere tutunma özelliği patogeneizde önemli rol oynar. Biyofilm oluşturan suşlar immün sistem ve antimikrobiyal ilaçlara daha dirençlidir ve bu durum tedavi başarısını etkilemektedir. Biyomateryal kaynaklı enfeksiyonların tedavisi çoğu zaman yabancı cismin çıkarılmasıyla çözülmektedir (18).

Candida albicans ağız mukozası ve plastik yüzeylere en iyi tutunan mantardır (24). Kandidaların konak dokuya tutunması blastospor fazında daha fazladır. Ortamda şeker bulunduğunda veya 2 değerlikli iyonlar (Mg^{+2} , Ca^{+2}) bulunduğunda tutunması artar. Örneğin, 50 mM galaktoz içeren besiyerinde üretilen kökenler göreceli olarak düşük yoğunlukta glukoz içeren besiyerinde üretilen kontrollerden on kat daha fazla tutunma göstermişlerdir. Dolayısıyla mannoprotein molekülleri tutunmayı sağlamakta ve virülansda önemli rol oynamaktadır (31). Mono ve disakkaritler tutunmayı pek az artırır, amino şekerler ise tutunmayı inhibe ederler (24). *C.albicans'* in yüzeyindeki mannoprotein fibriller taramalı elektron mikroskop teknikleri ile incelenmiş ve bunların

hücre yüzey hidrofobisitesi ile ilişkisi ortaya konmuştur. Hücre yüzeyinde mannoprotein fibriller arttıkça hidrofobisite ve dolayısıyla tutunmada artmaktadır (31). *Kandida* patojenitesi virülans faktörlerine bağlıdır. Bunlar; salgılanan hidrolitik enzimler, maya formundan hif formuna geçiş, antijenik değişiklik, fenotip değişimi, konak hücelere tutunma ve hücre yüzey hidrofobisitesidir (4).

Serolojik özgüllükten sorumlu olan yapı hücre duvarının dış yüzeyinde bulunan mannan yan zincirleridir (35,42). Manno protein antijenlerin konağa sunumu *C.albicans'* in patojenitesinde rol oynamaktadır çünkü bu mantarların hücre duvar içerikleri güçlü modülatör etkili moleküllerdir. Diğer yandan patojenin konağa yapışması enfeksiyon oluşmasının gerekliliklerinden bir tanesidir. İnsan epitelyal hücrelerine *C.albicans'* in tutunmasından manno protein ya da glikoprotein yapıda olan “adezinler” sorumludur (43,44). Asıl önemli kısmın protein kısmı olduğu da düşünülmektedir. Ayrıca *C.albicans* hücre duvar manno proteinleri in vivo sitotoksik hücreleri de uyarmaktadır. Bu özellik sitotoksik hücrelerin mikrobiyal patojen ve tümör gelişimi kontrolündeki rolleri nedeni ile de önemlidir (36). Deneysel çalışmalarda glikoproteinlerin verilmiş yoluna ve fraksiyonuna bağlı olarak hücre duvarının ya immünoadjuvan ya da immüno supresif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak *Candida albicans* manno proteininin immüno modülatör etkisinde hangi moleküler yapının sorumlu olduğu ortaya konulamamıştır. *Kandida türleri* ile doğada ve insan florasında sürekli ilişki içerisinde bulunmamız etkin molekülün bilinmesi açısından önemlidir.

2.6 *Kandida Türlerinin İmmün Sistemle Etkileşimi*

C.albicans' in konağa tutunmasında konak ile ilk karşılaşan kısım hücre duvar mannan yapısıdır (4,2). Hücre duvarının en dış katmanı konak ile etkileşimdedir ve anti-kandida immün yanıtlarının şekillenmesinde en önemli rolü oynar (4). Kandidalara karşı humoral ve hücre sel bağışıklık gelişmekle beraber hücre sel bağışıklığın rolü daha büyüktür. Genel olarak yüzeysel deri enfeksiyonlarında hücre sel bağışıklığın, sistemik enfeksiyonlarda ise doğal direncin yanında humoral bağışıklığın öne çıktığı söylenebilir (45). Maya formu enfekte dokuda çoğalabilmek, hif formu ise immün sistem hücrelerini işgal etmek için kullanılır (29). Mannan antijenik yapı olmasının yanısıra virülans da

rol oynar. Mantarlara karşı bağışıklıkta T hücre aracılı immünite reaksiyonları ana rolü oynamaktadır. Mantarların çoğu yüksek derecede immünojeniktir (46,45). Mantarlara karşı immün cevapta nötrofil, makrofaj ve bu hücrelerin aktive ettiği Th1 hücreler de rol oynamaktadır (29). Fagosit hücrelerden özellikle nötrofil ve makrofajlar, mantarların öldürülmesi için gereklidir. Nötrofiller, makrofajlardan daha fazla IL-10, IL-12 gibi yönlendirici sitokinlerin üretilmesini sağlarlar. Dentritik hücrelerin Th yanıtının başlatılmasında önemli rolü vardır. Mantarlarla ilişkisine bağılı olarak kandidalar ya deride kommensal olarak kalmakta ya da patojen olarak davranmaktadır. Dentritik hücreler mantarları fagositoz yaparlar ve mayalar hücre içerisine alındıktan sonra fagolizozom oluşturarak parçalarlar. Hifler fagolizozom membranı yırttıktan sonra sitoplazmaya kaçarlar. Dentritik hücrelerde mayalar içeri alındıktan sonra IL-12 ve NO üretilir, hifler böyle bir etki yapmazlar. Yani DH' ler *C.albicans*' in iki formuna karşı oluşturulacak bağışık yanıtı ayırt etme ve Th yanıtlarını etkinleştirme yeteneğine sahiptirler (29).

Kandida hücre duvarında bulunan mannan, T lenfositlerin duyarlı hale gelmesine neden olan antijendir. Mannanın hücresel ve hümoral yanıtı stimüle ettiği bazen de baskıladığı saptanmıştır (25) ve lenfositleri indükleyen en önemli antijen olduğı deneysel kanıtlarla gösterilmiştir (47). Duyarlı hale gelen T lenfositler lenfokin salgırlar ve makrofajları aktive ederler. Hücre duvarı, mantara fiziksel koruma sağlar (2), onu kompleman aracılı lizis gibi konak savunmalarına karşı dirençli kılar (45). Mantar hücre duvarı komponentlerini tanımak ve yanıt geliştirmek için, TLR ailesinden beta-glukan reseptörü, mannoz reseptörleri ve kompleman reseptörleri bu süreçte önemli rollere sahiptir (46,48). Enfeksiyonun erken döneminde pro-inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α ve IL-6) üretimi, gerek enfeksiyonun kontrol altına alınması gerekse koruyucu Th1 yanıtlarının gelişimi açısından gereklidir (29). Th1' in en ideal düzeyde reaktivasyonu ve idamesi için IL-4, IL-10 ve IL-18' in fizyolojik düzeylerde mevcudiyeti ve IL-12' nin üretimi gereklidir (29).

Bir canlının hastalıklara karşı korunmasında, patojenlerinin ve tümör hücrelerinin tanınıp yok edilmesinde görevli fonksiyonların tümü bağışıklık sistemini oluşturur. Doğal ve kazanılmış bağışıklık olmak üzere iki tip bağışıklık durumu vardır. Antijene özgül olmayan immün cevap diğeri adıyla akut faz cevabı da doğal bağışıklığı oluşturan

sistemlerden biridir. Akut faz reaktanları herhangi bir enfeksiyon esnasında vücutta miktarı artan ya da azalan, böylece bize enfeksiyon varlığını düşündürten genellikle protein yapıdaki maddelerdir. Miktarında artış yaşanan maddelere pozitif, azalanlara negatif akut faz reaktanı denir. A2M' de pozitif akut faz reaktanı olarak karşımıza çıkmaktadır. A2M; makroglobulin ailesinin bir üyesidir. Bu ailenin diğer üyeleri ise kompleman komponentleri (C3-C4-C5) ve pregnancy zone protein (PZP)' idir. Bu aile üyelerinin hepsindeki ortak nokta internal tiyol ester bağı içermeleridir. Bu bağ beta sisteinil ve gama glutamil arasındadır.

A2M, plazma proteinlerinin % 8-10' luk kısmını oluşturan büyük bir glikoproteindir ve glikolizasyon miktarına bağlı olarak 650-900 kDa arasındadır. 12. kromozomun kısa kolu üzerindeki 48 kb' lık 36 ekzon içeren bir gen tarafından kodlanan A2M' nin öncül proteini 1474 amino asitten oluşmuştur. Plazma çinkosunun % 10' luk kısmı serumdaki konsantrasyonu, 2-4 mg/mL olan alfa-2-makroglobulinle beraber taşınmaktadır. İnsanda başlıca sentezlendiği hücreler; hepatositler, akciğer fibroblastları, monosit-makrofajları, astrositler, bazı tümör hücre serileridir; melanoma hücreleri gibi. Birçok çalışma inflamasyonda proteinaz-proteinaz inhibitörü dengesinin sağlanmasında A2M' in görev aldığı göstermiştir. Bazı hastalıklarda plazma ve değişik hücre dışı sıvılarda A2M seviyesinin artmış olduğu gösterilmiştir, bunlardan amfizem (49), periodontitis (50), romatoid artrit (51), pnömoni (52), alzheimer hastalığı (53), akut ve kronik enfeksiyonlar sayılabilir. Serumda ve diğer sıvılarda elastaz, kollajenaz, plazmin, trombin, kallikrein gibi değişik moleküllerle kompleks yaptığı da bilinmektedir (54). İnsanda A2M eksikliği sadece bir vaka da tespit edilmiş ancak 1979 yılında rastlanan bu olgunun plazmasında, A2M' e özgül antikorlar tarafından tanınan, ancak elektroforetik mobilitesi daha düşük bir molekül gösterilmesine rağmen bu molekül tam olarak tanımlanamamıştır (55). Bugüne kadar insanda tam bir A2M eksikliği tanımlanmış değildir, bu da biyolojik olarak ne kadar önemli bir molekül olduğuna işaret eder. Alfa-2-makroglobulin, bir proteaz inhibitörü ve sitokin taşıyıcısı olarak işlev görür. A2M doğuştan kazanılmış immün sistemin evrimsel olarak çok iyi korunan bir moleküldür. Bu bilgilere dayanarak *C.albicans* ile immün sistem arasındaki ilişki incelenirken serum proteinlerinin en önemlilerinden olan A2M proteini seçilmiştir. Proteazlar ister endo ister ekzo kaynaklı olsun kanda serbest halde dolaştığında zararlıdır. Bunlar, insanların bağ doku hastalıklarında rol oynayan önemli ajanlardır, ayrıca prokaryot ve

ökaryot parazitlerin patojenitesine katkıda bulunan önemli virülans faktörleridir. Bu proteaz uyarımına karşı organizma birçok proteaz inhibitörü geliştirmiştir. Bu proteazlar 2 ana sınıfta toplanırlar, aktif bölgeyi inhibe edenler ve aktif bölgeyi kafesleyip yakalayanlardır. A2M güçlü yakalama ve kafesleme özelliği ile bilinen mekanik sınıflandırmalardaki (serin, metallo, sistein ve aspartat) bütün proteinazların inhibe edilmesinde görev almaktadır. A2M tarafından yakalanan proteinazlar halen küçük moleküller üzerinde etkili olabilmektedir ancak büyük kütleli proteinler A2M tarafından korunur. A2M, proteazı fiziksel olarak içine alıp yakalar bu yönüyle proteazları inhibe eden tek enzim inhibitörüdür.

A2M her biri 180 kDa' luk dört alt üniteden oluşmuş bir homotetramerdir ve silindirik görünümündedir. Bu alt üniteler ikişerli olarak disülfid bağlarıyla birbirlerine bağlanmışlardır ve A2M' nin bu iki tane birbirinden bağımsız fonksiyonel ünitesi "yarım molekül" olarak bilinmektedir. Bu moleküller ana A2M' nin redüksiyonu veya alkilasyonu ile oluşturulabilirler ki filogenetik olarak daha eski olan A2M' lerin yarım moleküller olarak bulunduğu gözlenmiştir. Her yarım molekül iki uzun ve iki kısa koldan oluşmak suretiyle dört koldan meydana gelmiştir ve bu iki yarım molekül bir halka ile birbirine bağlıdır. Birbirine disülfid bağlarıyla bağlı iki monomer, yarım molekül yapısını oluşturur. Her monomer bir uzun bir de kısa koldan oluşur. Her yarım molekülde bulunan bu uzun kollar proteazı yakalayan kollardır (56). İnhibisyon işlemi, proteinazların A2M' in iç oluğuna yerleşmesi ile başlar. "Tuzak bölgesi" diye tabir edilen bölgeden özel bir aminoasit bölgesinin kesimlenmesi ile birlikte bir sisteine bağlı tiyo-ester bağının çıkarılmasıyla A2M ile proteinaz arasında kovalent bağ oluşur (57). Parça kopması ve proteinazla bağlanma sonucu konformasyon değişikliği ile reseptörüne bağlanma bölgesi oluşur, Bilinen en önemli reseptörü LRP' dir. LRP' ye bağlanma sonucunda proteinazların temizlenmesi (58,59) ve sinyal iletim yolunun uyarılması sağlanır (60, 61).

A2M' nin elektroforezde gözlenen yavaş ve hızlı formları vardır. Hızlı formu proteazı yakalayıp konformasyonel değişime uğrayan daha kompakt bir yapıdadır ve elektroforezde bu yüzden yavaş formundan daha hızlı yürür. Bu hızlı formun gözlenebilmesi için iki yarım molekülün bir arada olması lazımdır ve bu da A2M' nin tetramerik formunu oluşturur. Her yarım molekül birbirine kovalent disülfid bağlarıyla

bağlı iki monomerden oluşur fakat iki yarım molekül birbirlerine nonkovalent bağ ile bağlıdır. Dolayısıyla sadece SDS muamelesi ile A2M iki dimer moleküle dönüşür fakat disülfid bağları kopmaz sadece iki yarım molekül birbirinden ayrılır (62).

Hastalıklarda A2M' in yükselmiş seviyelerine rağmen inflamasyonda proteolitik doku parçalanması gerçekleşir. Bakteri enfeksiyonları ve otoantijenlere karşı inflamasyon cevabında oksidasyonun rolü bir çok literatürde gösterilmiştir (63,64). Oksidatif burst (patlama) sırasında makrofaj veya nötrofillerin saldığı oksidanlar mM seviyesine kadar çıkabilmektedir. İnflamasyonla artan proteolizise; A2M gibi proteinaz inhibitörlerinin katılımı molekülün oksidasyonu sonucu olabilmektedir (65). Proteinlerin oksidatif modifikasyonu birçok amino asit dizilerinin örneğin; sistein, metionin, tirozin, triptofan ve lizin gibi değişimine neden olur. Vücutta hiçbir enfeksiyon gözlenmezken de A2M düzeyinde artış gözlendiği bilinmektedir. Embriyogenez, çocukluk ve hamilelik, plazma A2M düzeylerinin fizyolojik olarak yüksek seyrettiği dönemlerdir ki, bunlar hayattaki üç önemli sürece farklılaşma, gelişme ve büyüme evreleri ile paralellik göstermektedir. Alfa-2-makroglobulin; proteaz inhibitörü olarak görev yapmasının dışında sitokin taşıyıcısı olarak da işlev görür. Büyüme faktörlerinden olan bFGF, b-NGF, PDGF, ve TGF- β doku hasarı tamir mekanizmalarında görev yaparlar; angiogenezis, fibroblast proliferasyonu, düz kas hücre proliferasyonu, kollajen depolanması ve nöronal rejenerasyonunda işlev görürler. Bu büyüme faktörlerinin hücre fonksiyonlarını regüle edebilmesi için A2M' ne bağlanmasını engelleyen veya bağlı olduğu A2M' den salınmasını sağlayan bir mekanizma olmalıdır. Oksidasyon, büyüme faktörleri ve sitokinler arasındaki ilişkide kilit mekanizma olarak iş görür. Şöyle ki; okside olmuş A2M; TNF- α , IL-2 ve IL-6' yı tutarak akut inflamasyonun ilerlemesini azaltarak düzenlerken A2M' ne bağlanmış bFGF, b-NGF, PDGF, ve TGF- β ' yi de salarak doku tamir süreçlerinin gelişimini artırarak düzenler (66). Yapılan diğer bir çalışmada ise okside A2M' in TNF- α , IL-2, ve IL-6' ya bağlanmalarının arttığı ve b-NGF, PDGF-BB, TGF- β 1, ve TGF- β 2' ye bağlanmalarının ise azaldığı gösterilmiştir (67).

C.albicans' ın immün sistem üzerine olan etkilerinin doğal şartlardaki immünite ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Deney hayvanı modellerinde, *C.albicans* aracılığı ile konakçıda agresif tümörlere veya enfeksiyöz ajanlara karşı korunma sağlanmaktadır (68,69). Bu nedenle *C.albicans* güçlü bir biyolojik yanıt modifikatörüdür ve

immünomodülatör etkisi olduğu anlaşılmıştır (70,71,72). *C.albicans* aracılığı ile gelişen immünomodülatör etki bu mantarın insan kommensal florasının bir parçası olması nedeniyle özel bir durum oluşturmaktadır. Hücre duvarı doğal immün hücreler tarafından tanınan patojen-bağıntılı moleküler paternlerin çoğunu içerir (2) ve insan serumunda anti-mannan antikorların bol miktarda var olduğu gösterilmiştir. Hücre duvarı mannanına karşı serumda pozitif presipitin testinin kandidiyaz tanımı için değeri sınırlıdır. Enfeksiyon sırasında dolaşan mannanın veya anti-mannan antikorların belirlenmesinin dissemine kandidiyaz tanımında uygulanması için çift yönlü immünoelektroforez, radyoimmün assay, ELISA ve lateks aglütinasyon deneyleri bulunmaktadır. Serumda veya diğer vücut sıvılarında mantar antijenlerinin tespit edilmesine yönelik testler invazif mantar enfeksiyonlarının serolojik tanısı için daha değerlidirler. Bu amaçla mannan, D-arabinitol, enolaz ve β -D-glukan araştırılmaktadır, en yaygın kullanılan ise mannan antijen testidir (73). Hücre duvarının mannan dışındaki antijenleri ile sitoplazma antijenlerinin belirlenmesi ile ilgili deneyler geliştirilmiştir (74). ELISA ile mannan varlığının tespit edilmesinin duyarlılığı % 23-100 ve özgüllüğü % 92-100 olarak bildirilmektedir. Serumda mannan belirleyen ticari testler Cand-Tec (Ramco Laboratories Inc., Houston, Texas) sistemi diğer metodlara kıyasla % 30 - % 50 oranında duyarlı bulunmuştur. Bir diğer ticari sistem Pastorex *Candida* (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) testi ümit verici görülmektedir, ancak bir klinik çalışmada testin duyarlılığı % 0 olarak da bulunmuştur (32). Bazı çalışmalarda ise Cand-Tec sisteminin β -1,3 bağı için düşük özgüllük ve hassasiyete sahip olduğu da ifade edilmektedir (75).

3 GEREKÇE VE AMAÇ

Hastane kaynaklı mantar enfeksiyon etkeni olarak *C.albicans* dördüncü sıradadır. Bu enfeksiyonlar ciddi morbidite ve mortaliteye yol açarak aile, hastane ve ülkeye önemli zararlar vermektedir. Uygulanan tedavilerle birlikte patojen mantar türlerinin spektrumu ve direnç paternleri değişmektedir. Özellikle tiazol grubu antifungallerin profilaktik olarak sık kullanımları sonucu daha dirençli kandida türleri gelişmiş, kolonizasyon ve sistemik enfeksiyonlar artmıştır. Bunun sonucunda farklı hedefleri etkileyen yeni ilaçlara ve tedavi uygulamalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Modern tıptaki gelişmelere rağmen mevcut tanı yöntemleriyle erken tanı her zaman kolay olmamaktadır ve yeni mantar testlerinin geliştirilmesi önem kazanmaktadır. *C.albicans* insanda hem kommensal hem de patojen olarak bulunabilen bir mantardır. Maya hücre duvarı mantar-konak ilişkisinde önemli rol oynamaktadır. Çünkü tutunmada rol oynayan hücre duvarının en dış tabakasıdır. 37 °C’ de serum veya RPMI içerisinde maya 3-4 saatte germ tüp oluşturmakta ve hif formuna dönmektedir. Maya hif yaptığında hücre duvarında yapısal değişiklik meydana gelmektedir. Hücre duvarında yer alan proteinlerin yapısı değişmekte ve hif formunda damarlara daha çabuk bağlanmaktadır. Yani hif formu maya formunda olmayan çeşitli antijenik özelliklere sahiptir. *C.albicans* hücre duvarının ana komponenti mannan yapıdır ve primer fizyopatolojik önemi vardır. Bu çalışmada; maya ve hif hücre duvar formu arasındaki farklılıkların açıklanabilmesi için mannan yapının konfigürasyon değişimi ve ifadesi monoklonal ve poliklonal antikorlar kullanılarak aydınlatılmak istenmiştir. Böylelikle serumda mannan belirleyen ticari testlerin duyarlılığı ve özgüllüğünü artıracak yeni determinantlar tespit edilebilecek ve ticari test sistemlerine ilave yapılabilecektir. Bununla birlikte hif formuna geçişin immün sistem üzerine etkisi ile daha önce yayınlanmış çalışma yoktur. Enfeksiyon oluşturan kandida antijenlerinin, immün sistem proteinlerinden evrimsel olarak çok iyi korunan alfa-2 makroglobulin molekülü seçilerek üzerinde bir etkisinin olup olmadığının da araştırılması hedeflenmiştir. *C.albicans*’ ın antijenik yapılarının tanımlanması ve bunların immün sistem üzerine olan etkilerinin ortaya konulması kandida ile sürekli temas halinde bulunmamız nedeniyle önemlidir.

4 MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 Materyaller

4.1.1 Mantarlar ve bakteriler

- *Candida albicans* (ATCC 26555)
- *Salmonella choleraesuis* (211) (Institute Pasteur, France)
- *Salmonella infantis* (Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Hüseyin Avni Öktem' ten alınmıştır.)

4.1.2 Hücre suşu

- F0 myeloma hücresi (Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Cemalettin Aybay' dan alınmıştır.)

4.1.3 Primer kültür

- Dişi fare periton makrofaj hücresi

4.1.4 Besiyerleri

- RPMI 1640 w/o L-Glutamine, 500ml, Lonza, BE12-167F.
- Hypoxanthine-Thymidine-HT Media Supplement [50X], Sigma, H0137.
- Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine-HAT Media Supplement [50X], Sigma, H0262.
- YEPD-Buyyon/ YEPD-Agar
- LB-Agar

4.1.5 Deney hayvanı

6 haftalık (25–30 gr) dişi Balb/C fareler immünizasyon için kullanıldı. Fareler değişik büyüklükte kafeslerde 3-6 adet olarak barındırıldı. 25°C sabit sıcaklıkta, 12:12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde tutuldu. İçme suyu ve laboratuvar denek hayvanı yemi “ad libitum” kısıntı olmaksızın verildi. Deneyler sonrası hayvanlar servikal dislokasyon ile ötenazi edildi. Çalışmamız, Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Etik Kurulu karar sayısı 2012-16-104 ve tarihi 01.08.2012 ile onay almıştır.

4.1.6 Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar aşağıda listelenmiştir:

Cihaz	Marka, Model
Su banyosu	Nüve
-80°C derin dondurucu	Sanyo
-20°C derin dondurucu	Uğur Derin Dondurucu
+4 buzdolabı	Uğur Buzdolabı
Sınıf II biyogüvenlik kabini	MetiSafe
Sıvı azot tankı	International Cryogenics, Inc. Director D-4000
Otoklav	ALP
Açılır başlıklı soğutmalı santrifüj	Santrifüj Allegra X15-R Beckman Coulter
Santrifüj	Santrifüj Microfuge 18
Güç Kaynağı	Hofer PS200-HC
pH metre	Jenco 6173
CO ₂ etüv	Caron,Oasis incubator
Etüv	Memert
Mikroskop	Leica
Thoma lamı	Marienfeld, Cat no: 0640710
ELISA Reader Molecular Devices	SpectraMax M2
ELISA Washer	Biotek ELX50
Çalkalayıcı	FINEPCR
ELISA plak çalkalayıcı	Biosan PSU-2T plus
Vortex	Elektro-mag
Biologic Flow Kromatografi	Biorad

Liyofilizatör	Univapo 150 ECH
Görüntüleme cihazı	Kodak 4000 MM Versa Doc Imaging System 1000TM
Peristaltik pompa	Peri-star
Elektroforez sistemi	Hoefler®Tall Mighty Small (SE 280) System
Cell dissociation sieve-tissue grinder kit	Sigma, CD1
ImmunoPure Monoclonal Antibody	Pierce, 37501
Isotyping Kit (HRP/ABTS)	
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, 23225
SuperSignal West Pico	Thermo, 34080
Chemiluminescent Substrate Kit	
HiTrap Chelating HP (HiTrap affinity column)	GE Healthcare
Sefaroz bead	Sigma
Gradient Makers	Hoefler SG15
Pipet seti (0.1-3 µl, 0.5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl ve 1-10 ml)	Biohit
8 kanallı pipet (30-300 µl)	Biohit
Immünfloresan slide	-
Makas, ince ve kalın uçlu pens	-

4.1.7 Sarf malzemeleri

- 25, 75 ve 125' lik flask, CellStar, 82051-074, 82050-856, 82050-872.
- 0,22 ve 0,45 µm' lik steril filtre, Sarstedt Filtropur, 83.1826, 83.1826.001.
- 15 ve 50 ml' lik falkon tüp, Sarstedt, SS-4205, SS-7205.
- 5,000 kDa olan ultrafiltrasyon tüpleri, Vivaspın, VS15RH11.
- 6, 12, 24, 48 ve 96 kuyulu hücre kültür flaskı, Costar, 3506, 3512, 3527, 3598.
- Steril enjektör, Hayat, 8696569000227.
- Pastör cam pipet, Isolab, 084.01.001.
- Plastik pastör pipet, Isolab, 084.22.001.
- Pamuk

- Distile su/Bidistile su
- 0.1-10 µl-790011F, 0.5-20 µl-790021F, 2-120 µl-790101F, 5-200 µl-790201F, 5-300 µl-790301F, 10-500 µl-783206, 50-1000 µl-791001F, 50-1200 µl-791211F, Biohit tip.
- 6 cm² steril petri kabı, FıratPen, 8870000011.
- 1500 µl eppendorf tüp, Eppendorf, 0030125.150.
- ELISA plak ,Nunc, Lockwell C8, Maxisorp, NC-446469.
- Seal, Nunc, Easypeal- Easyseal, Sealing Tape, NC-236707.
- 1,8 ml Kriyovial tüp, Nunc, V7884.
- Cam deney tüpü.
- Lam-Lamel, Superior, C911050.
- 10.000 MW diyaliz membran, Thermo, 68100.

4.1.8 Kimyasal malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler aşağıda listelenmiştir:

Kısaltma	Kimyasal	Firma	Katalog No
FBS	Fetal Bovine Serum	Pierce	89986
PEG	Poli etilen glikol, Solution %50 w/v	Sigma	7181
DMSO	Dimetil Sülfoksit	Sigma	472301
HCl	Hidroklorik Asit	Merck	100317
C ₂ H ₄ O ₂	Asetik asit 99.8%	ACROS	64-19-7
H ₂ SO ₄	Sülfürik Asit	Sigma	339741
NaOH	Sodyum Hidroksit	Acros	1310-73-2
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma	L3771
NaBH ₄	Sodyum tetrahidraborat	Fluka	452173
NaCl	Sodyum Klorür	Merck	106404
NH ₄ SO ₄	Amonyum Sülfat	Fisher Biotech	7783-20-2
Na ₂ HPO ₄	Di-sodyum bi hidrojen fosfat	Fisher Biotech	7558-79-4
NaH ₂ PO ₄	Sodyum dihidrojenfosfat	Fisher Biotech	7558-80-7
KH ₂ PO ₄	Potasyum di-hidrojen fosfat	Merck	104873

KCl	Potasyum Klorür	Fisher Biotech	7447-40-7
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit	Sigma	E9884
ZnSO ₄	Çinko Sülfat	Merck	108883
PEG6000	Poli etilen glikol 6000	Merck	817007
BSA	Bovine Serum Albumin	Sigma	A7030
TMB	One Component HRP Microwell substrate	Surmodics	TMBW-1000-01
NaCO ₂	Sodyum karbonat	Fisher Biotech	497-19-8
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat	Fisher Biotech	144-55-8
A2M	Rekombinant Alpha-2 Macroglobulin,	RD systems	7836-AM-050
ACMK-1	<i>Candida albicans</i> antibody ACMK-1	Matriks Biotek Laboratories	
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat	Merck	105886
MgCl ₂	Magnezyum Klorür	Sigma	208337
APS	Amonyum persülfat,	Sigma	A3678
	Penisilin	BioShop	PEN333.25
	L-Glutamin	BioChrom	K0282
	OPI Media Supplement, Hybri-Max, γ -irradiated, lyophilized powder, suitable for hybridoma [100X]	Sigma	05003
	D-(+)-Mannoz	Merck	M6020
	Fenol	Merck	100206
	Tripton	Pronadisa	1612-500
	Sukroz	Sigma	S7903
	Triklor asetik asit	Merck	100807
	Gliserol	Gerbu-Ambresco	56-81-5
	Tris Base	Sigma	T1503
	Methanol $\geq 99.9\%$	Sigma	34860
	Paraformaldehit 96%	Fisher Biotech	30525-89-4
	5X Stabilcoat, Immunoassay stabilizer	SurModics	SC05-1000
	Affinity Purified Antibody	KPL	074-1807

Peroxidase Labeled Goat Anti-mouse IgG, IgA, IgM, Affinity Purified Antibody	KPL	074-1803
Peroxidase Labeled Goat Anti-mouse IgM Freund's Complete Adjuvan	Sigma	F5881
Freund's InComplete Adjuvan	Sigma	F5506
Poly-L-Lysine hydrobromide, mol WT \geq 300,000, Ethanol	Sigma Merck	P1524 100983
Fluorescein labeled affinity purified antibody to human IgM (μ)	KPL	202-1003
Ketalar	Pfizer	
Tween 20	Sigma	P2287
Stained-Marker, Pierce 3-Color Protein Molecular Weight Marker mix	Thermo	26691
Un-stained Marker, Protein Ladder	Biolabs	P7703S
ColorPlus Prestained protein Ladder, Broad Range(10-230 kDa)	NEB	P7711S
Pepton bacteriological, Yeast extract	Bioshop Pronadisa	PEP403.1 1702
Coomassie G-250	BioRad	161-0406
Sypro-Ruby	BioRad	170-3138
Laemmli Sample Buffer	Biorad	161-0737
2-merkaptoethanol	Sigma	M6250
Akrilamid	Merck	800830
Bisakrilamid	Merck	101546
Tris-Cl	Merck	108219
Temed	Amresco	0761
Agar	Bioshop	AGA003
2-propanol	Sigma	278475

4.2 Yöntemler

4.2.1 Mantar ve bakteri suşlarının hazırlanması

Candida albicans standart suşunun devamlılığı steril koşullarda YEPD-Agar (Yeast extract-5 g/l, Tripton-20 g/l, NaOH-0.25 ml, Dekstroz-20 g/l ve Agar-15 g/l, pH 6,8) besiyerine ekimi yapılarak 28 °C' de 3 gün inkübasyon sonunda sağlandı. Elde edilen kolonilerden YEPD-Buyyon (Yeast extract-5 g/l, Trypton-20 g/l, NaOH-0.25 ml ve Dekstroz-20 g/l) besiyerine pasajlar yapılarak çoğaltıldı.

C.albicans hif formu, kandida suşunun sıvı besiyerine ml' de 10 µg yaş hücre olacak şekilde pasajlanması ve 37 °C' de 3-4 saat çalkalamalı inkübatörde bekletilmesiyle elde edildi. *Candida albicans* ve hif formu elde edildikten sonra % 4 paraformaldehit w/v (PBS) çözeltisi ile fikse edilerek, +4°C' de muhafaza edildi.

Salmonella choleraesuis (211) ve *Salmonella infantis* suşlarının devamlılığı LB-Agar (Yeast extract-5 g/l, Tripton-10 g/l, NaCl-0,5 g/l, NaOH-0.001N ve Agar-15 g/l, pH 8) besiyerinde steril koşullarda 37 °C' de sağlandı. Elde edilen koloniler PBS (NaCl-136 mmol/L, Na₂HPO₄-8 mmol/L, KH₂PO₄-1,46 mmol/L, KCl-2,7 mmol/L) içerisine toplandı ve 99 °C' de su banyosunda 2 saat kaynatıldıktan sonra ELISA test sistemi için kullanıldı.

4.2.2 Hücrelerin hazırlanması ve depolanması

F0 myeloma hücre hattı

F0 myeloma hücre hattı complete RPMI (%1 v/v Penisilin, %1 v/v L-Glutamin, %9 v/v inaktive edilmiş FBS) besiyerinde 37 °C ve % 5 CO₂ içeren inkübatörlerde çoğaltıldı.

Fetal Bovin Serum İnaktivasyonu

-20 °C' de muhafaza edilen fetal bovine serum (FBS) 37 °C' deki su banyosunda çözünmesi sağlandıktan sonra 56 °C' deki su banyosunda 30 dk inkübe edilerek

inaktive edildi, ardından 50' şer ml' lik falkonlara parçalara bölünüp, tekrardan -20 °C' de kullanıma kadar muhafaza edildi.

Primer Kültür Eldesi

Sağlıklı 6 haftalık (25–30 gr) dişi Balb/C farelere servikal dislokasyon sonrası peritonuna 5-6 ml steril 37 °C' de su banyosunda bekletilmiş complete RPMI enjekte edildi. Biraz beklendikten sonra periton derisi kaldırıldı, bağırsakların delinmemesine özen göstererek enjeksiyon tekrardan çekildi. Bu sıvı 24 °C ve 500 g' de 20 dk santrifüjlendi (açılır başlıklı). Santrifüj sonrası elde edilen koyu renge yakın pellet bir miktar complete RPMI' da çözüldü, elde edilen makrofajlar flasklara yayılarak 37 °C ve % 5 CO₂ içeren inkübatörlerde çoğaltıldı. Yeterli çoğunlukta ve sağlıklı olan hücreler flaska hızlıca vurularak kaldırıldı, 400 rpm' de 4 dk santrifüj edildi. Bir miktar inaktif FBS' de pellet çözüldü. Hücreler kriyovial tüplere % 10 DMSO içerecek şekilde dağıtıldı ve kapağı hemen kapatılıp, kuru buz içerisinde gömüldü. Sıvının -80 °C' de tamamen donması sağlandı.

4.2.3 Hücre duvar antijenlerinin eldesi

YEPD-buyyon besiyerinde üretilen *C.albicans* mantar hücreleri eksponansiyel fazda toplandı. Bir kez % 0,9 NaCl, bir kez de distile su ile yıkandı, sonra hücre pelleti 20 mM sitrat tamponu, pH 7.0 ile süspanse edildi. Mannan içeriği, Ballou'nun tanımlamış olduğu metoda göre 125 °C, 90 dk otoklavlanarak ekstrakte edildi (76). Jelantöz madde 2500 rpm, 20 dk, 4 °C' de santrifüj edildi. Süpernatant üzerine mannopteinin çöktürülmesi için 3 hacim % 100 methanol ilave edildi ve 24 saat 4°C' de manyetik karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Presipitat toplandı, distile suda çözüldü ardından 4 °C' de 24 saat boyunca distile suya karşı diyaliz edildi (3 defa su değiştirilerek). Karbonhidrat tayini 4.2.6.' da anlatıldığı şekilde yapıldı. Elde edilen mannan kompleksi liyofilize edildi.

4.2.4 β-Eliminasyon

Liyofilize edilmiş olan mannoptein kompleksi 0.1 M NaOH ve 1 M NaBH₄ içerisinde çözüldü, oda sıcaklığında 4 gün karıştırıcı üzerinde bekletildi. Üzerine varolan hacmin 3 katı kadar methanol ilave edildi ve gece boyunca 4 °C’ de karıştırıldı. Daha sonra santrifügasyonla N ve O bağı ile bağlı komponentler ayrıştırıldı. N-bağı ile bağlı türe özgü mannan yapı pellet “mannan alt” olarak çökerken, O-bağı ile bağlı yapı süpernatanda “mannan üst” olarak kaldı. Elde edilen yapılar distile suya karşı 10.000 MWCO diyaliz tüpü kullanılarak diyaliz edildi, ardından karbonhidrat miktarı tayin edilerek -20 °C’ de muhafaza edildi.

4.2.5 Kandida alkalın ekstraksiyonu

C.albicans hücreleri, eksponansiyel fazda toplandı ve besiyerinden ayrıldı. 500 µl 1,85 M NaOH ve % 5 2-merkapttoethanol ilave edilip, 15 dk buzda bekletildi. Ardından 500 µl % 50 TCA ilave edilip, 15 dk buzda bekletildi. 3500 g’ de 4 °C’ de 10 dk santrifüj edilip, süpernatant atıldı. Pellet üzerine 0,13 ml % 75 gliserol, 0,23 ml distile su ve 0,08 ml % 25’ lik SDS solüsyonu kondu, 5 dk 96 °C’ de su banyosunda kaynatıldı. Kaynama sonrası 10000 rpm’ de 5 dk santrifüj edilip süpernatant toplandı (77). pH;1 M TrisCl (pH 8.8) çözeltisi ile titre edilerek 7.4’ e ayarlandıktan sonra 24 saat PBS’ e karşı diyaliz edildi (3 defa PBS değiştirilerek).

4.2.6 Karbonhidrat ve protein tayinleri

Karbonhidrat tayini; fenol sülfirik asit yöntemine göre yapıldı (78). Bunun için stok standart çözelti olarak 1 mg/ml mannoz çözeltisi kullanıldı.

Çizelge 4.1. Karbonhidrat tayini için standartların hazırlanması

Standart	Blank	A	B	C	D	E	F
Stok mannoz çözeltisi	0 µL	1 µL	2 µL	4 µL	6 µL	8 µL	10 µL
H ₂ O	100 µL	99 µL	98 µL	96 µL	94 µL	92 µL	90 µL

Çizelge 4.1’ de görüldüğü gibi standart çözeltiler hazırlandı. Miktarı bilinmeyen örneğin toplam hacmi 100 µl olacak şekilde 1/5 ve 1/25 dilüsyonları hazırlandı.

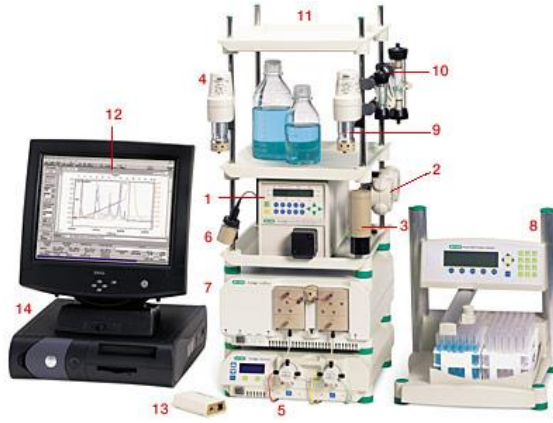
Üzerlerine 100 µl 0.1 M hidroklorik asit içinde % 5 fenol çözeltisi ilave edildi. 500 µl H₂SO₄ çözeltisi tüplere yavaşça çalkalanarak ilave edildi. 5 dakika 90 °C’ de su banyosunda inkübe edildi. Ardından 5 dakikada oda sıcaklığında bekletildi. Süre bitiminde cam tüplerden, 200 µl’ şer mikro plaka kuyularına dağıtılıp, spektrometrede 490 nm’ de okuma yapıldı. Protein tayini; BCA Protein Assay Kit (Pierce®) protokolüne uygun olarak yapıldı.

4.2.7 Alfa-2 makroglobulin eldesi ve saflaştırılması

Alfa-2 makroglobulin eldesi; Richard Swenson ve James Howards’ in önerdiği metoda göre yapıldı (79). Bunun için, 250 ml plazmaya 500 ml 0,02 M sodyum fosfat ve 0,1 M NaCl, pH 7.4 ilave edildi. % 50 PEG6000 solüsyonundan % 4 olacak şekilde ayarlanıp ilave edildi ve 30 dk +4 °C’ de bekletildi. Süre bitiminde 4000 g, +4 °C’ de santrifüj edilip, pellet atıldı. Süpernatantın PEG6000 konsantrasyonu % 12’ ye çıkarılıp, +4 °C’ de gece boyu manyetik karıştırıcı üzerinde bekletildi. Ertesi gün çözelti 4000 g, +4 °C’ de 45 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, pellet minimum miktarda 0,01 M sodyum fosfat, 5 mM EDTA, pH 7,6’ da çözüldü. Bu çözelti gece boyu distile suya karşı 10,000 MWCO’ luk diyaliz tüpü yardımıyla +4 °C’ de manyetik karıştırıcı üzerinde diyaliz edildi. Ertesi gün diyaliz olan plazma 4000 g, +4 °C’ de 45 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant üzerine 4 M (NH₄)₂SO₄ çözeltisinden 1.6 M olacak şekilde ilave edildi ve 45 dk +4 °C’ de inkübe edildi. Ardından 4000 g, +4 °C’ de 30 dk santrifüj edilip pellet üzerine 4 M (NH₄)₂SO₄ çözeltisinden 1.92 M olacak şekilde minimum hacimde ilave edilip, vortekslendi. 10 dk buzda bekletip, 30 dk, 4000g, +4 °C’ de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pelletler alınıp 2 defa 1.92 M (NH₄)₂SO₄ çözeltisi ile yıkama yapıldı. Pellet en son 0,01 M sodyum fosfat, 5 mM EDTA, pH 7,6 tamponunda minimum miktarda çözüldü ve sonra 0,01 M sodyum asetat pH 5,2 tamponuna karşı gece boyu 10,000 MWCO’luk diyaliz tüpü yardımıyla +4 °C’ de manyetik karıştırıcı üzerinde diyaliz edildi. Ertesi gün 0,01 M sodyum asetat pH 5,2 tamponu yenilenip diyalize gün boyu devam edildi. Sonra 45 dk, 4000 g, +4 °C’ de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant alınıp 0,025 M sodyum fosfat pH 7.6 tamponuna karşı gece boyu 10,000 MWCO’ luk diyaliz tüpü yardımıyla +4 °C’ de manyetik karıştırıcı üzerinde diyaliz edildi. Diyalizden alınan çözelti içerisinde saf halde A2M proteini kromatografik yöntemle alındı.

Alfa-2 makroglobulin saflaştırılması

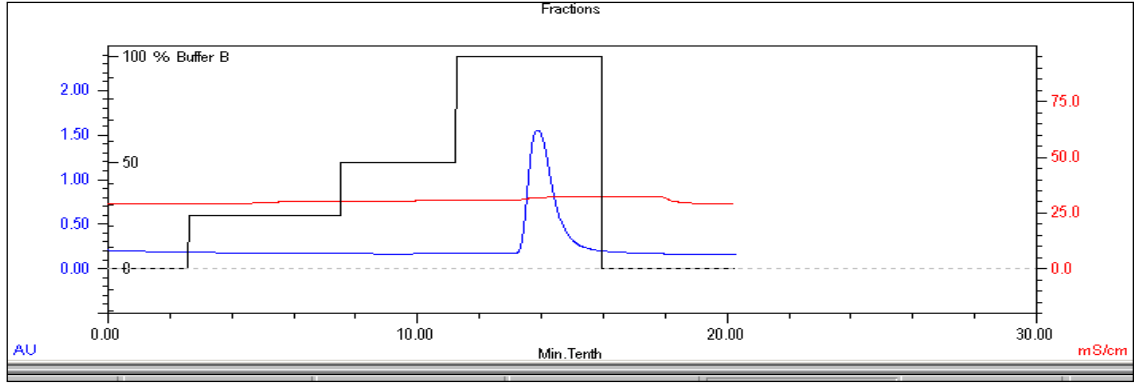
Biorad'ın BioLogic DuoFlow kromatografi sistemi kullanılarak yapıldı (Şekil 4.1.). Sistemde UV dedektörü, kondaktivite monitörü, fraksiyon toplayıcısı, enjeksiyon vanası, tampon seçici vana ve akış değiştirici vana bulunmaktadır. Tamponlar vanalara bağlanmadan önce filtreden geçirildi.



- 1- Dedektör
- 2- Seçici vana
- 3- Karıştırıcı
- 4- Akış değiştirici vana
- 5- Tampon karıştırıcı sistem
- 6- pH Monitörü
- 7- F40 çalışma istasyonu
- 8- Fraksiyon toplayıcı
- 9- Örnek enjekte eden vana
- 10- Kolon
- 11- Raf
- 12- BioLogic DuoFlow yazılım

Şekil 4.1. Biorad'ın Biologic Duoflow kromatografi sistemi

Sisteme afinite kolonu takılarak metal şelasyonu yapıldı. Şelasyon için 5 ml kolon hacmi olan HiTrap Chelating HP (HiTrap affinity column) kolonu kullanıldı. Bu kolonda dolgu maddesi olarak sefaroz, iyon tutucu olarak immünodiasetik asit ve metal iyonu olarak da çinko kullanıldı. Kolonu saflaştırma için hazırlarken, 3 kolon hacmi distile su, yarım kolon hacmi metal solüsyonu (0,1 M ZnSO₄), 3 kolon hacmi distile su ve 5 kolon hacmi bağlama tamponu (0,1 M Na₂HPO₄ pH 7, 0.15 NaCl) geçirilerek kolon stabil hale getirildi. Diyalizden alınan çözelti 10 ml' lik hacimlerde kolona verildi ve 5 kolon hacmi bağlama tamponu (0,1 M Na₂HPO₄ pH 7) geçirerek plazmadaki A2M' lerin çinkoya bağlanması sağlandı. Daha sonra pH' sı 5 ve 7 olan Na₂HPO₄ tamponu kullanılarak kolon içinde gradient oluşturuldu. En son % 100 elüsyon tamponu (0.1 M Na₂HPO₄ pH 5) kolondan geçirilerek çinkoya bağlanmış olan A2M' ler elüe edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. A2M' nin Biologic Duoflow kromatografisi ile saflaştırılması

5-10 purifikasyondan sonra kolondaki safsızlıktan kurtulmak için pH 7.2' de (0.1 M Na_2HPO_4 , 0.5 M NaCl, 0.05 M EDTA) “strip-off” işlemi yapıldı. Kolondan çinkonun ayrılması için çelasyon ajanı EDTA kullanıldı. Bu işlemlerden sonra kolondan tekrar su geçirerek kolona metal tuz solüsyonu (ZnSO_4 -çinko) yüklendi ve aynı işlemler uygulanarak A2M saflaştırıldı. Kolondan aldığımız A2M elüsyon tamponu içinde elde edildiği için pH' sı 5' tir. Bu nedenle 1 M Na_2HPO_4 (pH 8) ile pH' sı 7' ye getirilerek derin dondurucuda saklandı. Kolondan bu şekilde elüe edilen A2M' ler 5,000 kDa' luk ultrafiltrasyon tüpleri (Vivaspin) ile 1200 g' de 30 dakika santrifüj edilerek konsantre edildi. Konsantre edilmiş A2M' nin BCA protein tayin metodu ile protein miktarı belirlendi. Toplamda 250 ml plazmadan 25 mg' a yakın A2M elde edildi ve bölünerek bir sonraki kullanımına kadar $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ' de muhafaza edildi.

4.2.8 Monoklonal ve poliklonal antikor üretimi

İmmünizasyon

6 haftalık (25–30 gr) Balb/C ırkından toplamda 17 adet fare çizelge 4.2.' de gösterildiği şekilde ilk dozda tamamlanmış Freund adjuvan beraberinde, diğer dozlarda ise tamamlanmamış Freund adjuvan beraberinde immünize edildi.

Çizelge 4.2. İmmünizasyon protokolü

Antijen	Doz	Veriliş Yolu & Aracı	Hacim	Veriliş Sıklığı
<i>Candida albicans</i> hücre (% 4' lük paraformaldehit ile fikse edilmiş)	750 µg (Pzt), 1500 µg (Çrş) ve 3000 µg (Cuma) yaş hücre /hayvan-adjuvanla birlikte	İntraperitoneel& İnsülin iğnesi yardımıyla	300 µl	Bir gün arayla haftada 3 gün
Alfa-2 makroglobulin	250 ug protein/hayvan-adjuvanla birlikte	İntraperitoneel& İnsülin iğnesi yardımıyla	300 µl	İki haftada 1

İmmünizasyona her iki antijen içinde 6 ay boyunca devam edildi. Her hafta hayvanların genel sağlık durumları kontrol edildi. Her ay sonunda fareden alınan kuyruk kanından serum elde edildi ve antikor yanıtı ELISA test sistemi ile kontrol edildi ve serumdaki antikor yanıtının en az 1:1.000,000 olması sağlandı. Uygun antikor seviyesi elde edildikten sonra servikal dislokasyondan 1 gün önce farelere en son uygulanan doz miktarında PBS içerisinde antijen enjekte edildi (Final Boost).

Poliklonal Antikor Eldesi

10 adet fare anti-A2M antikor eldesi için kullanıldı. Serumdaki antikor yanıtı uygun seviyeye geldiğinde hayvan başına 100 µl ketalar enjekte edilerek uyuşturulduktan sonra servikal dislokasyon yapıldı. Ardından hayvanın gözünden kapiller tüp yardımıyla kan alındı. Oda sıcaklığında bir süre pıhtılaşması beklendikten sonra 14000 g' de 15 dk santrifüj edildi. Elde edilen anti-A2M poliklonal serumu 0.22 µm por çaplı steril filtreden geçirildikten sonra alikvatlarına ayrılıp, -20 °C' de muhafaza edildi.

Monoklonal Antikor Eldesi

7 adet *C.albicans* serotip A suşu ve 10 adet A2M proteini ile immünize edilen hayvanların dalakları monoklonal antikor eldesi için kullanıldı. 37 °C' de su banyosunda ısıtılmış besiyeri içerisinde dalak, dissociation sieve-tissue grinder kit yardımıyla biyogüvenlik kabini içerisinde ezildi. Kontaminasyon riski oluşmayacak

şekilde elde edilen splenosidler 400 rpm' de 4 dk santrifüjlenmek suretiyle 2 defa yıkandı. Ve en son pellet 20 ml RPMI içerisinde çözüldü, mikroskop altında thoma lamı yardımıyla sayım yapıldı.

Füzyon yapılacak günden bir gün öncesinde F0 myeloma hücreleri HT besiyerine alındı. HT Besiyeri; % 10 FCS, 1x OPI, 1x HT, % 1.4 glutamin, % 1.4 penisilin, RPMI olacak şekilde hazırlandı. Ertesi gün F0 hücreleri kaldırıldı, 2 defa yıkandı ve 20 ml RPMI içerisinde çözülüp mikroskop altında thoma lamı yardımıyla sayım yapıldı. Makrofajlar ise bölüm 4.2.2' de açıklandığı şekilde hazırlandı ve 25 adet 48 kuyulu flaska 400 µl/kuyu olacak şekilde dağıtılıp inkübatörde bekletildi.

Füzyon işlemi için; F0 ve splenosidler 1 splenosid / 3 F0 hücresi olacak şekilde karıştırılıp, 400 rpm' de 4 dk santrifüjlendi. Oluşan pellet üzerine, hücre duvarının kimyasını bozup hücrelerin yapışmasını kolaylaştıracak 1 ml PEG-1500 solüsyonu 1 dakika içerisinde karıştırılarak ilave edildi. Ardından hemen 1 dakika içerisinde 1 ml' de RPMI damla damla karıştırılarak ilave edildi. Süre bitince 2 dakika içerisinde de 9 ml RPMI damla damla karıştırılarak ekleme yapıldı. Üzerine uygun miktarda HAT seçici besiyeri ilave edilip, 200 µl/kuyu olacak şekilde daha önce zemine periton makrofaj hücresi yayılmış 48 kuyulu flasklara yayıldı (makrofajlar üzerindeki eski besiyeri çekildikten sonra). İnkübatöre alınmadan önce füzyon işleminin gerçekleşip gerçekleşmediği mikroskop altında kontrol edildi. HAT Besiyeri; % 20 FCS, 1 x OPI, 1 x HAT, % 1.4 glutamin, % 1.4 penisilin, RPMI olacak şekilde hazırlandı. HAT seçici besiyeri kullanılarak ölümsüz hibridoma klonlarının oluşması için 7-10 gün kadar flasklar hareket ettirilmeden inkübatörde muhafaza edildi. 7. günde hibridoma kolonilerinin oluşup oluşmadığı mikroskop altında kontrol edildi. Koloni yoğunluğuna göre 7. gün veya 10. günde her bir kuyudan alınan besiyeri ile antikor yanıtı ELISA ile test edildi.

Koloni taraması sonucu yanıtın yüksek olduğu kuyulardan tek koloni seçimi gerçekleştirildi. Ve manuel olarak seçilen klonlar daha öncesinde zeminine makrofaj yayılmış plaklara aktarıldı. Monoklonlar, HAT seçici besiyeri varlığında çoğaltıldı. Sık sık koloni tarama testleri ELISA ile yapılarak yanıtın yüksek olduğu klon seçildi.

Yanıtın yüksek olduğu kuyudan manuel olarak tekrardan seçim (sub-kloning) yapılarak spesifik olan klon tespit edildi. Yapılan ELISA tarama testleri ile yanıt gelişimleri kontrol edildi. Aranan klonların seçimi yapıldıktan sonra yavaş yavaş plak hacmi genişletilerek fazla miktarda klon elde edildi. Bu süreç içerisinde klonların besiyerine salgılamış oldukları antikorların eldesi için kültür süpernatantları toplanarak -20 °C' de muhafaza edildi. 1000-2000 ml arası süpernatant toplandıktan sonra klonlar dondurularak sıvı azotta saklandı.

4.2.9 Hibridoma antikorlarının saflaştırılması ve tuzların uzaklaştırılması

Proteinler, çözünürlüklerine göre ayrılıp saflaştırılabilirler. Yarı doymuş konsantrasyondaki amonyum sülfat çözeltisinin globülinleri çöktürdüğü prensibi temel alınarak IgG ve IgM antikorları saf halde elde edebilmek için <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm> linki hesaplamada kullanıldı. Çalışma sıcaklığı 25 °C, başlangıç hacmi var olan kültür süpernatant hacmi, hedeflenen amonyum sülfat yüzdesi IgG için 40 ve IgM için 35, başlangıç amonyum sülfat yüzdesi 0 olarak hesaplama yapıldı. Hesaplama ile elde edilen amonyum sülfat miktarı manyetik karıştırıcı üzerinde yavaş yavaş süpernatanta ilave edildi. Ayırma işlemi sırasında proteinlerin denatüre olmaması için çöktürmeler buz üzerinde yapıldı. Ardından manyetik karıştırıcı üzerinde soğukta gece boyu beklendi. Ertesi gün 45 dk, 4000 g, +4 °C' de santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Pellet soğuk steril PBS çözeltisinde çözüldü. Protein çözeltisindeki tuzların uzaklaştırılması için solüsyon 10,000 MW diyaliz torbasına kondu ve PBS' e karşı +4 °C' de gece boyunca diyaliz edildi. Tampon 3 defa değiştirildi ve çok yavaş bir şekilde karıştırıldı. Ertesi gün protein tayinleri BCA kiti ile, izotiplendirmeleri ise ImmunoPure Monoclonal Antibody Isotyping Kit ile yapıldıktan sonra parçalarına ayrılıp -80 °C' de muhafaza edildi.

4.2.10 ELISA testi

Plastik kuyucuklar; 100 µg hücre/ml, 20-70 µg protein/plak ve 40 µg şeker/plak konsantrasyonu şeklinde 0,05 M Na₂CO₃/HCO₃, pH 9.6 kaplama solüsyonu ile her

kuyuda 100 µl hacim olacak şekilde kaplandı. Plak üzeri seal ile kapatıldı ve +4 °C' de 24 saat inkübe edildi. Ertesi gün plak +4 °C' den çıkarıldı, 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Yıkama tamponuyla (PBS - % 0,5 Tween 20) 100 µl/kuyu olacak şekilde 3 defa yıkandı. Plak içi havlu kâğıda hızlıca vurularak kurutuldu. 200 µl/kuyu olacak şekilde bloklama ajanı (1X Stabil Coat, SurModics, 100:1 FCS, PBS-Tween 20 içerisinde) eklendi ve üzeri kapatıldıktan sonra 30 dk 37 °C' de ardından 30 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Süre bitiminde plak içi aspire edildi. Primer antikor 100 µl/kuyu olacak şekilde dağıtıldı ve 2 saat çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Süre bitiminde yıkama tamponu ile 100 µl/kuyu olacak şekilde 3 defa yıkandı. Plak içi havlu kâğıda hızlıca vurularak kurutuldu. Sekonder olarak anti-fare IgM antikor (2500:1) 100 µl/kuyu olacak şekilde dağıtıldı. 45 dk çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Süre bitiminde yıkama tamponu ile 100 µl/kuyu olacak şekilde 3 defa yıkandı. Plak içi havlu kâğıda hızlıca vurularak kurutuldu. TMB Substrat 100 µl/kuyu olacak şekilde ilave edildi, 10-15 dk karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1 M H₂SO₄ çözeltisinden 50 µl/kuyu olacak şekilde ilave edildi ve 450 nm'de okuma yapıldı. ELISA testinde, "cut off" değerinden yüksek olan durumlar pozitif yanıt olarak değerlendirildi.

Cut off: Ortalama negatif kontrol+(Std.Sapma negatif kontrol)².

4.2.11 İmmünfloresans ile boyama testi

IF plak kuyuları sırayla 20 µl distile su, % 70 etil alkol ve tekrardan distile su ile yıkandı. Kuyulara 20 µl Poly-L-Lysine kondu, bekletildi, tekrardan çekildi. Paraformaldehit ile fikse edilmiş hücreler 100-200 µg/10 ml PBS olacak şekilde hazırlandı ve floresan lam kuyularına 20 µl' şer kondu ve kuruması sağlandı. Kuruma işlemi tamamlanınca primer antikorlar 20 µl' şer olacak şekilde kuyulara ilave edildi. 37 °C' de 2 saat benmari usulü inkübe edildi. Süre sonunda kuyular PBS ile yıkandı. Sekonder olarak anti-fare IgM-FITC (2500:1) ilave edilip 37 °C' de 1 saat benmari usulü inkübe edildi. Süre sonunda lam üzeri PBS ile yavaşça yıkandı. Kuyular üzerine (9 gliserol:1 PBS) solüsyonundan köpük oluşturmadan ilave edildi. Lam üzeri kapatıldı ve karanlık ortamda floresan mikroskobunda görüntülendi.

4.2.12 Denatüre ve Denatüre edici olmayan poliakrilamid jel elektroforezi

Poliakrilamid Jel Elektroforezi, Laemmli (1970) tarafından önerilen yöntem kullanılarak yapıldı. Dikey jel sisteminde, etanol ile yıkanıp kurutularak temizlenen cam plakaların arasına önce 1,0 mm kalınlıkta % 5-20' lik gradient denatüre ve denatüre edici olmayan ayırıcı jel gradient maker cihaz yardımıyla döküldü ve üzeri su ile doyurulmuş izobütanol ile kaplandı. Gradient jel hesabı Çizelge 4.3.' de gösterildi.

Çizelge 4.3. % 5-20' lik gradient jel hesabı

GRADİENT	% 5	% 20	Yükleme jeli
Akrilamid (% 30)	840 µl	3,3 ml	333 µl
Tris 1.5 M pH 8.8	1,25 ml	1,25 ml	-
Tris 0.5 M pH 6.8	-	-	625 µl
dH₂O	2,85 ml	-	1,5 ml
% 10 APS	45 µl	10 µl	12,5 µl
Temed	3 µl	3 µl	2,5 µl
Sukroz	-	750 mg	-
% 10 SDS	50 µl	50 µl	25 µl

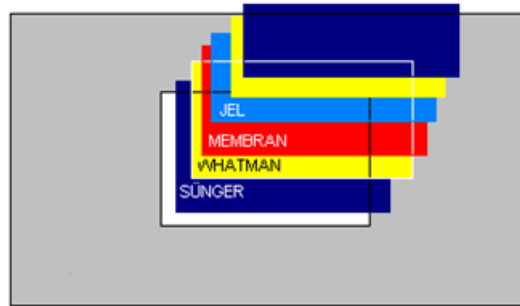
Polimerizasyondan sonra izobütanol çözeltisi döküldü. Üzeri distile su ile yıkandı ve tarak yerleştirilecek % 4' lük yükleme jeli döküldü. Yükleme jelinin polimerizasyonu sonrasında tarak çıkarıldı. Jel yürütme tamponu: 5X, 1 L pH 8.3, (Tris 15 g, Glisin 72 g, SDS 5 g) ile dolduruldu. Referans olarak kullanılacak büyüklükler kuyulara yüklendi. Konsantrasyonları kantitatif olarak belirlenen örneklerden yaklaşık eşit miktarlarda örnek yükleme tamponu varlığında yükleme yapıldı. Örnekler denatüre jele yüklenecekse % 3, 2-merkaptethanollü örnek yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra 100 °C' de 5 dk inkübe edilip, yükleme yapıldı. Jele 18-20 mA elektrik akımı uygulandı. Örneklerin yürütülmesi işleminin tamamlanmasının ardından, jel cam plakalar arasından çıkarılarak boyama işleminde veya Western Blot analizinde kullanıldı.

Coomassie brilliant blue ile boyama yapılacaksa; jel izopropanol fiksasyon (% 25 izopropanol, % 10 asetik asit) çözeltisi içerisinde alındı, 30 dk fikse edildikten sonra gece boyu coomassie brilliant blue (% 10 asetik asit, % 0,006 G-250) içerisinde çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Ertesi gün tekrardan 30 dk fikse edildikten sonra görüntüleme yapıldı.

SyproRuby ile boyama yapılacaksa; jel % 10 metanol, % 7 asetik asit içeren fiksatif çözeltisi içerisinde alındı, 30 dk fikse edildikten sonra gece boyu karanlıkta SyproRuby boya içerisinde çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Ertesi gün tekrardan 30 dk fikse edildikten sonra görüntüleme yapıldı.

4.2.13 Western-Blot analizi

Membrana aktarım SemiDry metodu ile yapıldı. PVDF membran kağıtları kesilerek hazırlandı. Membran kağıdının hidrofobik özelliğini azaltmak için metanol içerisinde 5 dk inkübe edildikten sonra 10 dakika transfer çözeltisinde bekletildi. Ardından membran, sünger ve whatman kağıtları transfer tamponu ile ıslatıldı. Transfer tamponu olarak 25 mM Tris, 192 mM Glisin ve % 20 Metanol pH 8.3 kullanıldı. Eğer jel reduced ise transfer tamponuna % 0,5 SDS' de ilave edildi. Blot içerisinde yerleşim şekil 4.3.' de gösterildiği gibi yapıldı.



Şekil 4.3. Blot içerisindeki yerleşim planı

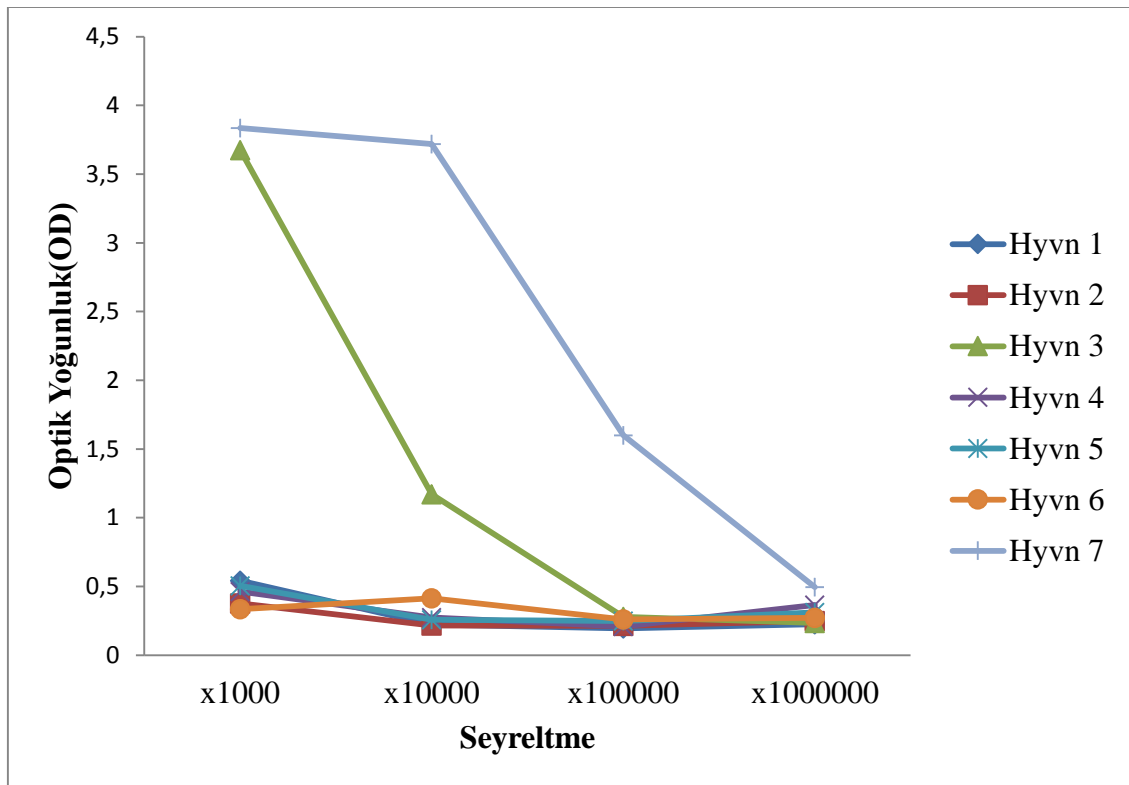
Transfer cm^{2^2} ye 0,82 mA akımla 45 dakikada yapıldı. Membrana aktarımın başarıyla yapıp yapılmadığı PonceaS ile kontrol edildikten sonra su ile yıkandı. Transfer kontrol edildikten sonra membran PBS-Tween 20 (% 0,1) içerisinde hazırlanmış % 3 BSA çözeltisi ile gece boyu blokladı. Ertesi gün membran PBS-Tween 20 yıkama tamponu

ile 3' er kez 10' ar dakika yıkandı. Primer antikor uygun miktarda ilave edildi, 2 saat karıştırıcı üzerinde bekletildi. Ardından tekrardan 3' er kez 10' ar dakika yıkandı. Membran sekonder olarak HRP işaretli uygun antikor ile 1 saat karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Sonra PBS-Tween 20 yıkama tamponu ile 3' er kez 10' ar dakika yıkama yapıldı. Ardından Super Signal West Chemiluminescent substrate kiti ile boyama yapıldı. Görüntüleme Kodak MM4000 görüntüleme cihazında yapıldı.

5 ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1 Anti-*C.albicans* Monoklonal Antikor Eldesi:

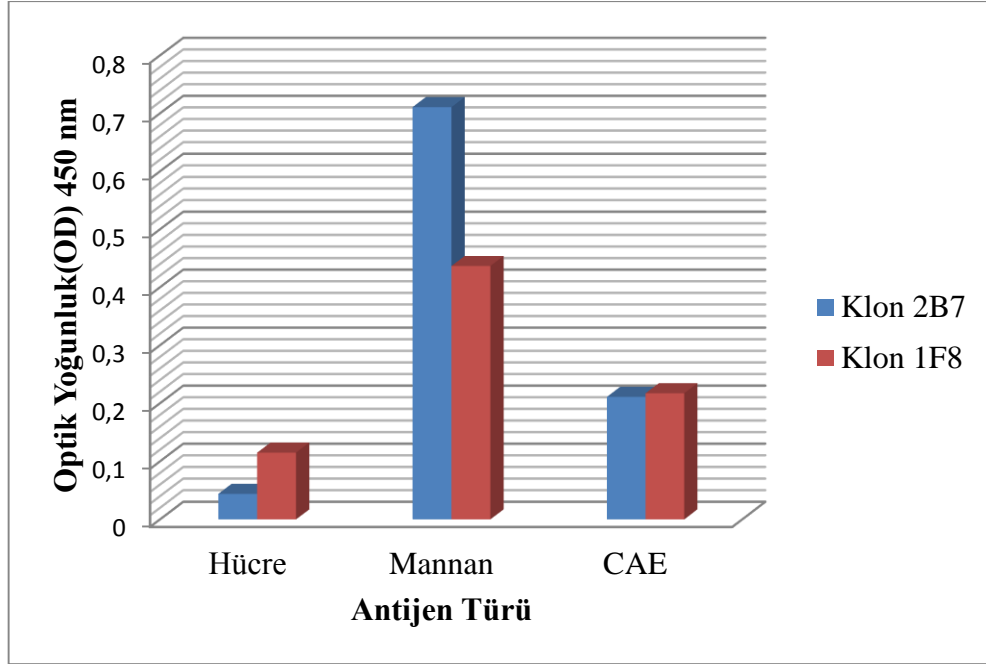
Aşılama periyodu sonrasında farelerden alınan serumların antikor titreleri ELISA yöntemiyle kontrol edildi (Şekil 5.1.). Plak, 100 µg *C.albicans* yaş hücre/ml olacak şekilde 0,05 M Na₂CO₃/HCO₃, pH 9.6 tamponuyla kaplandı. Sekonder olarak anti-fare IgG+A+M (5000:1) kullanıldı.



Şekil 5.1. Bağışıklanan farelerde ELISA ile ölçülen antikor titresi sonuçları

Hem maksimum bağlanma hem de antikor titresi bakımından yüksek yanıt veren Hyvn 7 faresinin splenositleri hibridoma eldesinde kullanıldı. Füzyondan sonra klon oluşumu gözlenen kuyulardaki hücrelerin besiyerleri ELISA yöntemi tekrar tekrar test edildi. Toplamda 480 adet kuyu tarandı. Antijene (*C.albicans* mannan, CAE ve *C.albicans* hücre); yüksek yanıt veren 154 adet klon 48' lik plaklardan seçilerek 96' lık plaklara aktarıldı. Devam eden klon seçim ELISA testlerinde hedefimize uygun daha spesifik hücre hattı eldesi amacıyla sekonder olarak anti-fare IgG+M (5000:1) kullanıldı. Yapılan klon tarama ELISA testleri sonucunda 32 adet klon seçildi. Şekerlere karşı IgM

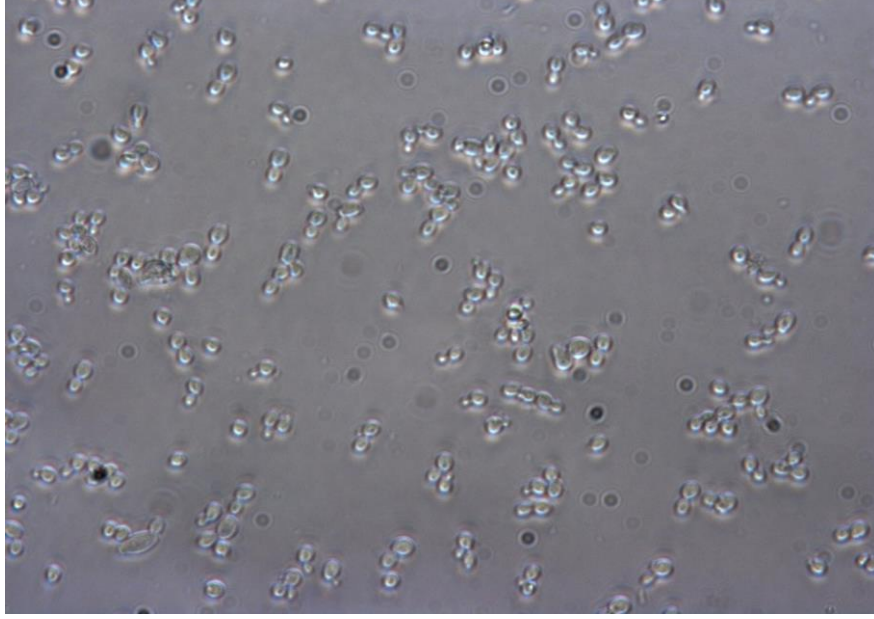
yapıda daha spesifik antikor yanıtı gelişmesi beklenildiğinden devam edilen testlerde sekonder olarak anti-fare IgM (2500:1) kullanıldı. 32 adet klon içerisinde her üç antijenle yüksek yanıt veren 2 adet monoklonal antikor 2B7 ve 1F8 seçildi (Şekil 5.2). Antikorlar materyal yöntemde belirtildiği şekilde saflaştırılıp, tuzlarından arındırıldıktan sonra fonksiyonellikleri test edildi.



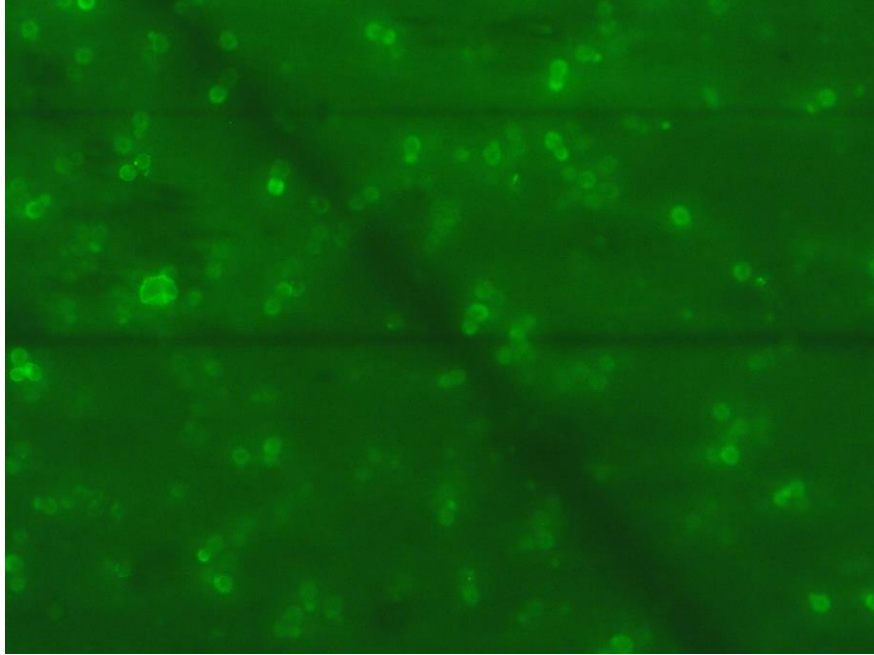
Şekil 5.2. Klon tarama ELISA testleri sonucu pozitif yanıt veren hücre hatları Klonların OD değerlerinden “cut off” değerleri çıkarıldıktan sonra grafik oluşturuldu. Cut off değerleri; Hücre:0.358, Mannan:0.539, CAE:0.263.

5.2 Anti-*C.albicans* Monoklonal Antikorumun Fonksiyonelliğinin Gösterilmesi:

Pozitif yanıt verdiği kabul edilen klonların fonksiyonelliği immünfloresan boyama yapılarak gösterildi. Paraformaldehitte fikse edilmiş *C.albicans* mayası ile klon 2B7 ve klon 1F8 antikorları immünfloresans ile test edildi. Sekonder olarak anti-fare IgM-FITC kullanıldı. En iyi ışımayı veren 2B7 monoklonal antikorunu fonksiyonel olarak pozitif kabul edildi (Şekil 5.3 ve 5.4). 2B7 klonu anti-fare IgM (mu chain specific) ve anti-fare kappa hafif zincir yapısındadır.



Şekil 5.3. *C.albicans* maya formu faz kontrast mikroskopi görüntüsü. Primer: Klon 2B7 süpernatantı



Şekil 5.4. *C.albicans* maya formu immünfloresans görüntüsü. Primer: Klon 2B7 süpernatantı

5.3 2B7 Antikorumunun *C.albicans* N-Glikolizasyonla Bağlı Mannan ile Testi:

2B7 monoklonal antikorumunun hangi epitoplara karşı olduğunu anlamak üzere hücre duvarı mannan ekstraktı β -eliminasyona tabi tutuldu ardından elde edilen antijenle antikorumuz ELISA ile test edildi. 2B7 monoklonal antikoru çizelge 5.1.' de

gösterildiği gibi *C.albicans* N-glikolizasyonla bağlı mannan yapısı ile daha yüksek yanıt verdi.

Çizelge 5.1. 2B7 antikoru ile *C.albicans* N-glikolizasyonla bağlı mannan ile ELISA testi sonucu

Plak Kaplama Türü	<i>C.albicans</i> N-glikolizasyonla bağlı mannan (40 µg/plak)
Primer	2B7 süpernatanı
Sekonder	Anti-fare IgM (2500:1)
Yanıt	0,945 (1/100 titrede)
Blank	0,247

5.4 2B7 Monoklonal Antikorumun Benzer Yapıdaki Bakteriler ile Testi:

mAb 2B7, hücre duvar yapısı lineer formda β -1,2 mannandan oluşan *S.choleraesuis* (211) ve *S.infantis* ile pozitif yanıt verdi. Sonuç çizelge 5.2.' de gösterildi.

Çizelge 5.2. 2B7 monoklonalinin *S.choleraesuis* (211) ve *S.infantis* ile ELISA testi sonuçları

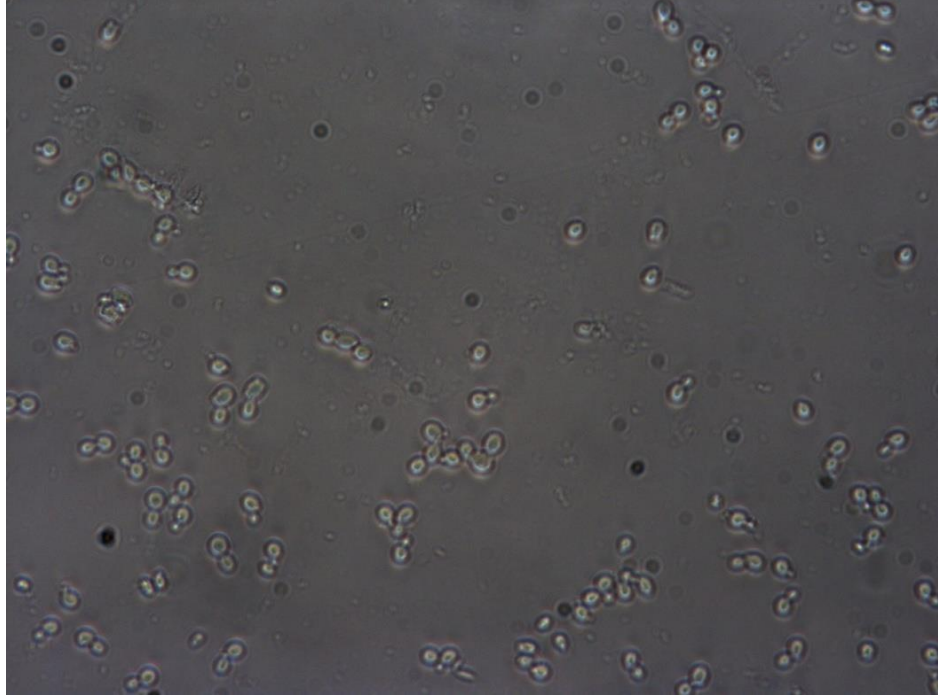
Plak Kaplama Türü	<i>Salmonella choleraesuis</i> (211) hücre (100 µg/ml)	<i>Salmonella infantis</i> hücre (100 µg/ml)
Primer	2B7 süpernatanı	2B7 süpernatanı
Sekonder	Anti-fare IgM (2500:1)	Anti-fare IgM (2500:1)
Yanıt	2,429	2,070
Blank	0,244	0,221

5.5 ACMK-1 mAb' unun *C.albicans* maya ve hif formu ile testi:

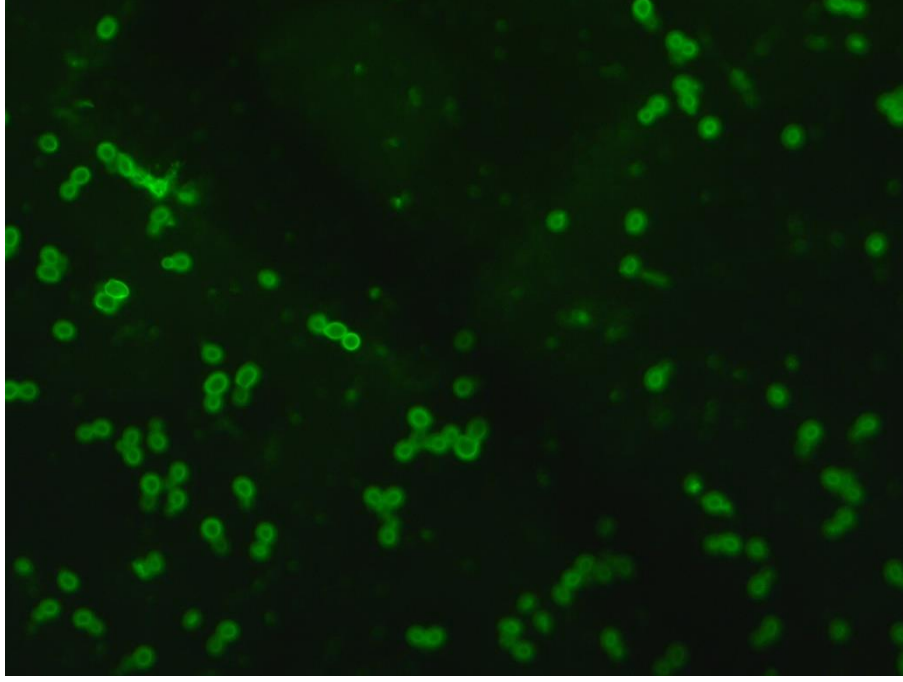
Kandida hücrelerinin morfolojik değişimi esnasında hücre duvar mannan yapısında meydana gelen antijenik değişkenliği tanımlamak için farklı araçlar kullanıldı. β -1,2 bağına spesifik mAb ACMK-1 *C.albicans* maya formu ve CAE ile ELISA' da pozitif yanıt verdi. Sonuç çizelge 5.3.' de gösterildi. ELISA testinde pozitif yanıt veren tepkime immünfloresans ile de fonksiyonel olarak test edildi (Şekil 5.5. ve Şekil 5.6.).

Çizelge 5.3. *C.albicans* maya formu ve CAE ile ACMK-1 antikorunun ELISA testi sonuçları

Plak Kaplama Türü	<i>C.albicans</i> hücre (100 µg/ml)	CAE (15 µg/plak)
Primer	ACMK-1 antikoru (8000:1)	ACMK-1 antikoru (8000:1)
Sekonder	Anti-fare IgM (2500:1)	Anti-fare IgM (2500:1)
Yanıt	0,972	0,560
Blank	0,279	0,238

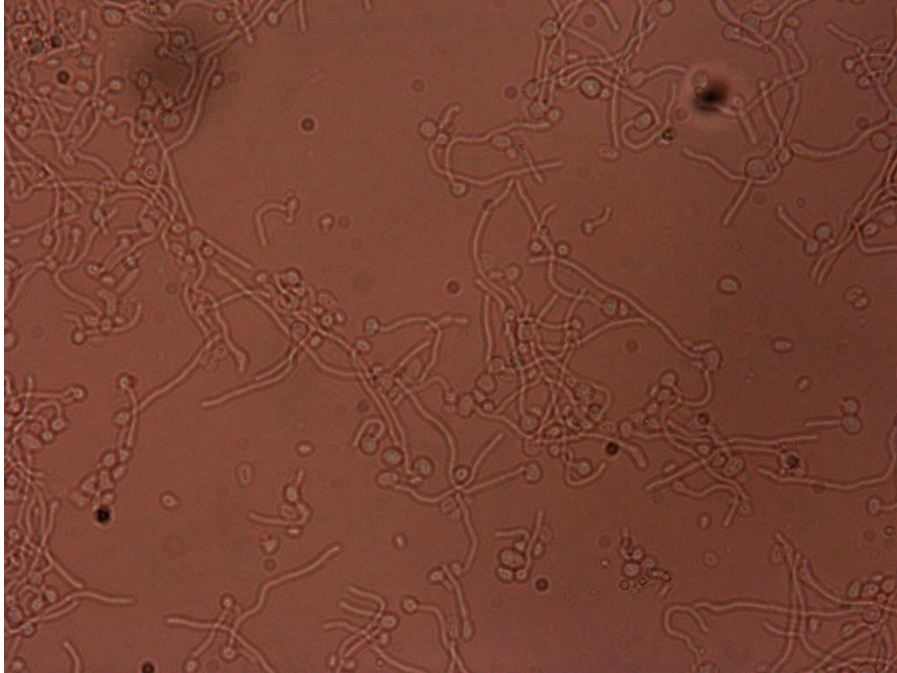


Şekil 5.5. *C.albicans* maya formu faz kontrast mikroskopi görüntüsü. Primer: ACMK-1 antikoru

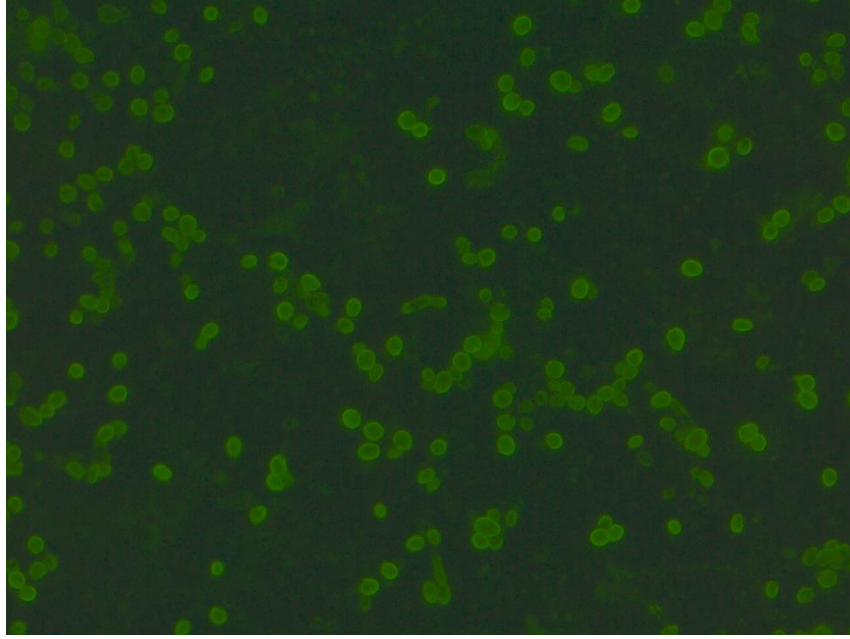


Şekil 5.6. *C.albicans* maya formu immünfloresans görüntüsü. Primer: ACMK-1 antikor

Bunun yanında, ACMK-1 monoklonal antikoruna maya formu ile Şekil 5.7.'de gösterildiği gibi IF' da ışımaya verirken, hif formu ile ışımaya vermedi (Şekil 5.8.). Bu durum, β -1,2 bağlı mannanın maya hif yapıldığında morfolojide meydana gelen değişiklik nedeniyle hif uzantılarında görünmediğini gösterdi.



Şekil 5.7. *C.albicans* hif formu faz kontrast mikroskobisi görüntüsü. Primer: ACMK-1 antikor



Şekil 5.8. *C.albicans* hif formu immünfloresans görüntüsü. Primer: ACMK-1 antikorü

5.6 ACMK-1 antikorunun *Salmonella choleraesuis* (211) ile testi:

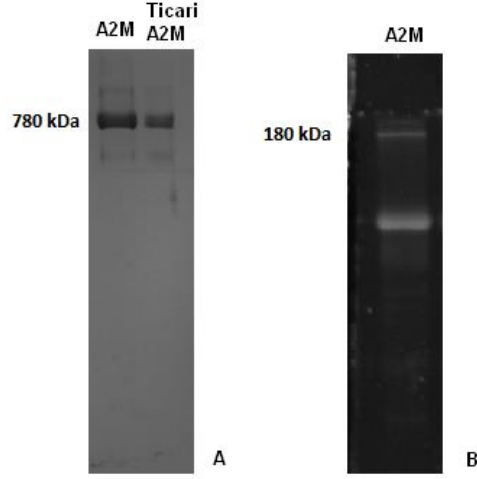
ACMK-1 mAb, dallanmış β -1,2 mannan duvar yapısı olan *C.albicans* ile pozitif yanıt verirken, lineer β -1,2 mannan duvar yapısı olan *S.choleraesuis* (211) ile yanıt vermedi. Sonuç çizelge 5.4.' de gösterildi.

Çizelge 5.4. *C.albicans* maya formu ve *S.choleraesuis* (211) ile ACMK-1 antikorunun ELISA testi sonuçları

Plak Kaplama Türü	<i>S.choleraesuis</i> (211) hücre (100 μ g/ml)	<i>C.albicans</i> hücre (100 μ g/ml)
Primer	ACMK-1 antikorü(8000:1)	ACMK-1 antikorü(8000:1)
Sekonder	Anti-fare IgM(2500:1)	Anti-fare IgM(2500:1)
Yanıt	0,187	0,972
Blank	0,279	0,279

5.7 Plazmadan Elde Edilen A2M' in Elektroforez ile Doğrulanması:

İnsan plazmasından elde edilen A2M proteini denatüre edici olmayan jel elektroforezinde, 780 kDa ağırlığında tetramer yapıda görünürken, denatüre jel elektroforezinde 180 kDa monomer yapıda tespit edildi (Şekil 5.9.).



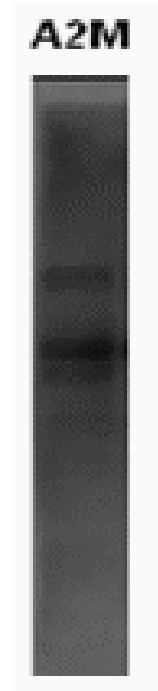
Şekil 5.9. Alfa-2 makroglobulinin denatüre edici olmayan (A) ve denatüre (B) % 5-20 gradient jel elektroforez görüntüsü

Proteinler 10 µg olacak şekilde kuyulara yüklendi. A: Coomassie G-250 ile boyandı. B: Sypro-Ruby ile boyandı.

5.8 Anti-Alfa-2 Makroglobulin Poliklonal ve Monoklonal Antikor Eldesi:

Poliklonal antikor eldesi:

A2M proteini ile aşılanan farelerden alınan serumlar Şekil 5.10.' da gösterildiği gibi poliklonal antikor özelliği taşımaktadır.

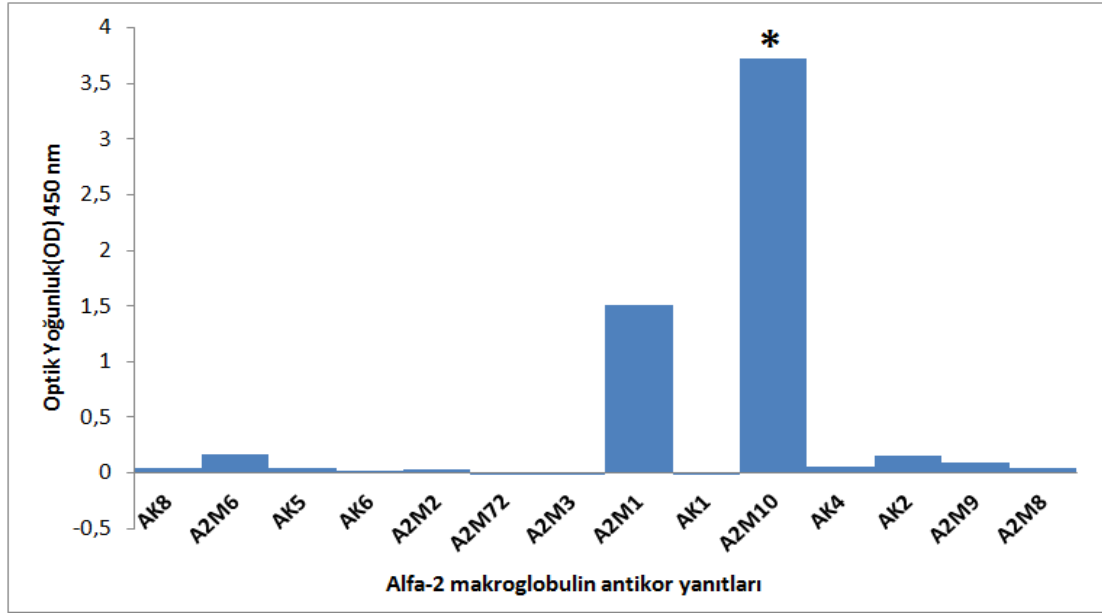


Şekil 5.10. A2M proteini, % 5-20 SDS-PAGE jel görüntüsü.

Sekonder olarak anti-fare IgG+A+M kullanıldı. 5 µg/kuyu olacak şekilde yüklendi. Boyama, Immun-Star HRP Chemiluminescent Kit (Biorad) ile 5dk karanlıkta yapıldı

Monoklonal antikor eldesi:

Anti-A2M monoklonal antikor eldesi için yapılan klon tarama testleri sonucunda ELISA’ da yüksek yanıt veren 14 adet klon seçildi. Seçim aşamasında hem *C.albicans* (Çizelge 5.6) ile hem de A2M (Şekil 5.11.) ile yüksek yanıt veren monoklonal A2M10 seçildi. Bu amaçla sekonder olarak anti-fare IgM kullanıldı. A2M10 klonu anti-fare IgM (mu chain specific) ve anti-fare kappa hafif zincir yapısındadır.



Şekil 5.11. Alfa-2 makroglobulin antikor yanıtları

Grafik OD değerlerinden “cut off” değerleri çıkarıldıktan sonra oluşturuldu. Cut off değeri: 0,214. *En yüksek yanıtı veren antikor A2M10 kodlu klondur.

5.9 mAb 2B7’ nin Serum Proteinlerinden A2M ile Testi:

Anti-*C.albicans* monoklonal antikorunu 2B7 çizelge 5.5’ de gösterildiği gibi serum proteinlerinden A2M ile çapraz reaksiyon verdi.

Çizelge 5.5. 2B7 antikorunun A2M ile ELISA testi sonucu

Plak Kaplama Türü	A2M (62,5 µg/plak)
Primer	2B7 süpernatanı
Sekonder	Anti-fare IgM (2500:1)
Yanıt	2,163
Blank	0,324

5.10 mAb A2M10' nin *C.albicans* Maya Formu ile Testi:

A2M10 antikorunu çizelge 5.6' de gösterildiği gibi *C.albicans* hücre duvar yapı komponentlerinden alkalın ekstraktı ve mannan ile de pozitif yanıt verdi.

Çizelge 5.6. A2M10 antikorunu ile *C.albicans* mannan ve CAE ile ELISA testi sonuçları

Plak Kaplama Türü	<i>C.albicans</i> mannan (40 µg/plak)	CAE (15 µg/plak)
Primer	A2M10 süpernatanı	A2M10 süpernatanı
Sekonder	Anti-fare IgM (2500:1)	Anti-fare IgM (2500:1)
Yanıt	3,005	3,850
Blank	0,222	0,313

6 TARTIŞMA VE SONUÇ

Sistemik kandidiyazis bağışıklığı baskılanmış hastalarda fırsatçı bir enfeksiyon olarak karşımıza çıkmaktadır. Kandida türü mayalar hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemlilerinden biridir ve bu türden kandidal enfeksiyonların yaklaşık yarısı yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda görülür (39). Bu hastalarda *C.albicans* derin doku invazyonu gösterir ve yaşamı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara neden olur (8). Sistemik kandidiyazın önlenmesinde ve tedavisinde kullanılan flukonazol, ketokonazol ve flusitozin vb. gibi ilaçlara karşı direnç gelişmesi sebebiyle yeni antifungallere ihtiyaç duyulmaktadır. Maya mantarlarının neden olduğu kandidemide erken tanı ve tedavi önemlidir (21). Hastalara uygulanan tanı ve tedavi uygun olmadığında hem mortalite ve morbidite artmakta hem de ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Kandida türlerinin hücre duvar yapısı, mantar-konak ilişkisinde ve virülansında çok önemlidir (4). *C.albicans* hücre duvarının ana komponentlerinden biri mannan yapısıdır (26,34,7) ve antijenik olarak değişkenlik gösterir (34). Bu durum in vivo/in vitro ve kendi içinde de farklı çoğalma koşullarına göre değişkenlik gösterir. Mannan yapının benzer olabilmesi için çoğalma koşullarının aynı olması gerekmektedir (34). Sistemik ve derin enfeksiyonlarda *C.albicans* maya mantarının hif yapma özelliği önemli virülans faktörlerinden birisidir. Kandida mannan yapısının değişik özelliklerinin belirlenmesiyle immün sistem etkileşimi daha açıklık kazanacaktır.

C.albicans' ın form değiştirdiğinde hücre duvar mannan yapısının monoklonal ve poliklonal antikorlarla aydınlatılmasının araştırıldığı çalışmamda *C.albicans* serotip A, antijenik yapısı nedeniyle serotip B' yi de kapsamından dolayı tercih edildi. Serotip A' da hem asit modifiye β -1,2 bağlı mannan yapılar hem de serotip A' ya özgü aside dirençli β -1,2 dallanmaları yer almaktadır. Aynı zamanda serotip A klinik kökenler arasında serotip B' den daha fazla bulunmaktadır. 6 aylık immünizasyondan sonra farelerden alınan serum antikor titresini ELISA yöntemiyle test edildi. Spesifitesi iyi bir monoklonal antikor eldesi için serum titresinin yüksek olması tercih edildi (80,81). Şekil 5.1.' de gösterildiği üzere 1:1000000 titrede olan 7 numaralı fare splenositleri hibridoma oluşturmak üzere kullanıldı.

Mannan yapısı serolojik yanıtı oluşturan en önemli kandida antijeni olduğundan lenfositleri indükleyerek T hücrelerinden bağımsız direkt B hücre aktivasyonu ile yanıt oluşturur. T hücrelerine bağımlı yanıtta bütün antikor sınıfları üretilirken T hücrelerinden bağımsız yanıtta esas olarak IgM oluşur. T hücreleri tarafından üretilen IL4 (B hücre gelişme faktörü) ve IL5 (B hücre farklılaşma faktörü), üretilen ilk immünglobulin sınıfı olan IgM yerine IgG, IgA, IgE gibi diğer sınıfların üretilmesi için sınıf anahtarını çevirmektedir. Bu durum, sınıfın açılıp kapatılmasında yardımcı T lenfositleri tarafından üretilen lenfokinlerin gerektiğini gösterir. T hücrelerine bağımlı yanıt bellek B hücreleri üretirken, T hücrelerinden bağımsız yanıtta bu durum dolayısıyla sekonder antikor yanıtı görülmez ve IgM yanıtı sınıf değiştirmez. Bu nedenle hibridoma seçimlerimizde sekonder olarak anti-fare IgM tercih edildi. O. Eloy ve ark. yaptığı çalışmada da % 100 özgüllük ve % 86 duyarlılıkla IgM antikorları anti-candidaları yakalamak için en iyi test sistemi olarak ifade edilmiştir (82). *C.albicans*, mannan ve CAE antijenleri şekil 5.2.' de gösterildiği üzere kullanıldı ve pozitif yanıt veren 2B7 klonu elde edildi. Yapılan izotiplendirme ile 2B7 antikorunun anti-fare IgM yapıda olduğu gösterildi. María D. Moragues ve ark. yaptığı bir çalışmada *C.albicans* hücre duvar mannoproteinine karşı elde edilen monoklonal (MAb C7) antikor da IgM yapıda elde edilmiştir (83).

2B7 monoklonal antikorunun hangi epitoplara karşı olduğunu anlamak üzere hücre duvarı mannan ekstraktı β -eliminasyona tabi tutuldu sonuç olarak elde edilen antijenlerle antikorumuz ELISA ile test edildi. β -eliminasyondan sonra çizelge 5.1.' de görüldüğü üzere reaktivitenin devam ettiği gözlemlendi ve bu sayede oluşan antikorun sadece ortak antijene karşı değil aynı zamanda türe özgü olan N-glikolize mannan yapısı ile de reaksiyon verdiği tespit edildi.

C1 grubu Salmonellaların (*Salmonella choleraesuis* (211) ve *Salmonella infantis*) hücre duvar yapısı *C.albicans* ile benzerlik göstermektedir. Kandida türlerinin mannanı, çeşitli bağlarla bağlı dallanmış mannan moleküllerinden oluşur. *Salmonella* türlerinin O antijenleri ise tekrarlayan ünitelerden oluşan lineer zincirlerden oluşur. C₁ serogrubu için iskelet yapı β -Manp(1 \rightarrow 2)- α - Manp (1 \rightarrow 2)- α - Manp (1 \rightarrow 2)- α - Manp (1 \rightarrow 3)- β -GlcNac-(1 \rightarrow 2) şeklindedir (84). 2B7 monoklonal antikoru çizelge 5.2.' de gösterildiği gibi *Salmonella choleraesuis* (211) ve *Salmonella infantis* ile çapraz reaksiyon verdi.

Nnalue N.A. ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada *kandida türlerinin* mannanı ile *Klebsiella* K24 polisakkariti ve *Salmonella* C₁ ve E O-antijenleri arasında da çapraz reaksiyon tespit edilmiştir (84).

C.albicans' ı diğer kandidalardan ayıran en önemli özelliklerden biri germ tüp oluşturmasıdır. Yapılan çalışmalarda gösterildiği gibi faktör 5 serumu asit labil β -1,2 bağlı manooligosakkarite karşılık gelir (85). Bununla birlikte ticari olarak temin edilebilen ACMK-1 monoklonal antikoru mannan yapısındaki β -1,2 bağına spesifiktir. β -1,2 bağlı mannoz ünitelerinin daha antijenik yapıda olduğu literatürde bildirilmiştir (4). Cutler ve ark. yaptıkları bir çalışmada β -1,2 bağlı manooligosakkarite karşı elde edilen monoklonal antikorun kandidiyazis ve vajinal enfeksiyonu önlediği gösterilmiştir (86). Yine Lee ve ark. flukonazol ile β -1,2' ye karşı elde edilmiş olan monoklonal antikorunu kombine bir şekilde kullandıklarında kandidiyazise karşı etkili olduğunu göstermişlerdir (4). Bizim çalışmamızda β -1,2' ye spesifik monoklonal antikor ACMK-1 ile *C.albicans* hem ELISA hem de immünfloresansla test edilmiş çizelge 5.3., şekil 5.5. ve şekil 5.6.' da gösterildiği üzere bu testlerden pozitif yanıt alınmıştır ve *C.albicans* maya formu yüzeyinde β -1,2 bağının var olduğu doğrulanmıştır. Bunun yanında *C.albicans* hif yaptığında hücre duvar yapısında değişiklik meydana gelmektedir. Bu çalışmada hif oluşumundan sonra, şekil 5.7. ve şekil 5.8.' de gösterildiği üzere ACMK-1 monoklonali *C.albicans* maya formu ile floresans verirken hif yapısıyla ışımamıştır. İlk defa elde edilen bu veri ile maya hif duvarında β -1,2 mannan bağlarına ya çok seyrek ya da hiç rastlanılmadığı gösterilmiştir. β -1,2 bağına spesifik olan ACMK-1 monoklonal antikoru, hücre duvarı lineer formda β -1,2 bağına içeren suşlardan *Salmonella choleraesuis* (211) ile test edildi ve çizelge 5.4. gösterildiği üzere çapraz reaksiyon vermedi. ACMK-1 ve 2B7 monoklonali β -1,2 bağına tanımlamasına rağmen epitop özellikleri farklı olduğundan 2B7 monoklonali *S.choleraesuis* (211) ile reaksiyon verirken ACMK-1 monoklonali reaksiyon vermemiştir. *C.albicans*, normal florada maya mantarı şeklinde iken doku invazyonu sırasında genellikle hif formundadır. Hif formu bazal laminada yer alan büyük bir protein olan laminine bağlanarak derin doku invazyonuna neden olur. Mayanın hif oluşturma yeteneği, değiştirilmiş veya zayıflatılmış *C. albicans* mutantları kullanıldığında hifal büyüme ile kandida kaynaklı konukçu ölümleri arasında

korelasyon gösterilmiştir(87). Maya formundan hif formuna geçiş yeteneği aydınlatıldığı takdirde yeni antifungallerin geliştirilmesi mümkün olacaktır.

Maya antijenlerine karşı immün yanıtta hem hücresel, hem de salgısal immün sistem rol oynamaktadır, özellikle makrofaj ve granülosit kökenli hücreler (nötrofiller) letal kandida enfeksiyonlarına karşı immün yanıtta önemlidir. *C.albicans* ile enfeksiyon sırasında doğal immün hücrelerin yüzeyindeki patern tanıma reseptörleri tarafından mantar hücre duvar bileşenlerinin tanımlanması doğal immün sistem yanıtını başlatır. Hif-spesifik hücre duvar proteinleri temel antijenlerdir ve aynı zamanda tutunma ve invazyonda immün yanıtı şekillendirme fonksiyonları vardır. Maya ve hif hücrelerinde ki β -1,3 glukan aynıdır. fakat maya hücrelerine göre hif hücrelerinde β -1,3 glukan daha az yer almaktadır (14). Ancak mayaların çeşitli morfojenetik formlarının immün sistemle ilişkisinin nasıl olduğu literatürde hala net değildir (14). Bu nedenle doğuştan kazanılmış bağışıklık sisteminin evrimsel olarak çok iyi korunan molekülü, alfa-2 makroglobulin yapısında mannozil glikolizasyon ve α -mannoz olması sebebiyle seçilerek *C.albicans* ile immün sistem arasındaki ilişki araştırılmıştır. A2M; α -1,2 bağlarını kapsamaktadır ve benzer bağlar *C.albicans*' da da yer aldığından bu etkileşim önemlidir. Çalışmamızda A2M; saf proteini elde edildikten sonra (şekil 5.9.) immünizasyonda kullanıldı, ardından serum alınarak poliklonal antikor havuzu olarak kullanılmıştır (şekil 5.10.) ayrıca hibridoma seçimine tabi tutularak monoklonal antikor, A2M10 elde edildi (şekil 5.11.). Monoklonal A2M10 anti-fare IgM ve anti-fare kappa light chain yapısındadır. Çalışmamızda *C.albicans* hücre duvar yapısına karşı elde edilen 2B7 monoklonal antikoru insan serum proteinlerinden A2M ile çizelge 5.5' de gösterildiği üzere çapraz reaksiyon vermiştir. Yapıdaki benzer moleküllerin varlığı için bir çapraz reaksiyon olduğu gösterilmelidir. Bu amaçla A2M' e karşı elde edilen monoklonal, A2M10 klonu *C.albicans* ile test edilmiş ve çizelge 5.6' de gösterildiği üzere çapraz reaksiyon vermiştir. Yapılan testlerde ACMK-1' in, A2M ile reaksiyonu görülmemiştir.

Mannan yan zincirlerinin kimyasal yapısının tespiti *C.albicans*' ın patojenite mekanizmalarının aydınlatılmasında ve kandidiyazın önlenmesi ve tedavisinde önemlidir (8). Patojenite mekanizmalarının nedenleri aydınlatılırsa yeni anti-fungal ilaçların ve immünoterapötik prosedürlerin geliştirilmesi kaçınılmazdır. Çalışmamızda

elde edilen antikorlar ile enfeksiyon sırasında dolaşan mannanın veya anti-mannan antikorların ELISA veya IF gibi test sistemlerinde geliştirilmesi, bu antikorların in vitro/in vivo test tedavi yöntemlerinin denenmesi ve A2M gibi başka serum proteini ile çapraz reaksiyon olup olmadığının araştırılması ve elde edilen 2B7 monoklonal antikorunun enfeksiyon oluşturulmuş mikroorganizmalarda tedavi edici rolünün olup olmadığının araştırılması bundan sonraki çalışma planımızı oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

1. Molero G, Díez-Orejas R, Navarro-García F, et al., *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol*. 1998;1(2):95-106.
2. Mora-Montes HM, McKenzie C, Bain JM, Lewis LE, Erwig LP, Gow NAR., Interactions between macrophages and cell wall oligosaccharides of *Candida albicans*. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2012;845:247-260.
3. Ghannoum MA, Abu-Elteen KH., Pathogenicity determinants of *Candida*. *Mycoses*. 1990;33(6):265-282.
4. Shibata N, Kobayashi H, Suzuki S., Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2012;88(6):250-265.
5. Ataoglu H, Zueco J, Sentandreu R., Characterization of epitopes recognized by *Candida* factor 1 and 9 antisera by use of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants. *Infect Immun*. 1993;61(8):3313-3317.
6. Kantarcıoğlu A.S., Yücel A., *Candida albicans*'da mannan: çeşitli özellikleri ve önemi, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 2004; 35(1):1-11.
7. Summers DF, Grollman AP, Hasenclever HF., Polysaccharide Antigens of *Candida* Cell Wall. *J Immunol*. 1964;92(3):491-499.
8. Shibata N, Suzuki A, Kobayashi H, Okawa Y., Chemical structure of the cell-wall mannan of *Candida albicans* serotype A and its difference in yeast and hyphal forms. *Biochem J*. 2007;404(3):365.
9. Ustaçelebi Ş., *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Guneş Tıp Kitabevleri, 1999.
10. Peksari Y., Erbakan N., Derinin Mantar Hastalıkları ile Özdeşleşen Bir Yaşam, *Türk Klin J Dermatol Spec Top*. 2008;1(2):1.
11. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
12. 4. Türkiye Ekmud Kongresi, 9-12 May, 2012, İstanbul, Turkey.
13. Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev.*, 1995;8(4):462-478.
14. Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG., *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(2):112-122.
15. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, et al., International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected

from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2001;39(9):3254-3259.

16. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, et al., Epidemiology of Candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991–2000. *Clin Infect Dis.* 2004;38(3):311-320.
17. Yapar N., Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis, *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2014:10 95-105.
18. Demirbilek M., Timurkaynak F., Can F., Azap Ö., Arslan H., Hastane kaynaklı *Candida* türlerinde biyofilm oluşumu ve antifungal duyarlılık paternleri, *Mikrobiyol Bült* 2007; 41:261-269.
19. Andes DR, Safdar N, Baddley JW, et al., Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2012;54(8):1110-1122.
20. Uzun O, Anaissie EJ., Predictors of outcome in cancer patients with candidemia. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 2000;11(12):1517-1521.
21. Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP., Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med.* 1988;148(12):2642-2645.
22. Murciano C, Moyes DL, Runglall M, et al., *Candida albicans* Cell Wall Glycosylation May Be Indirectly Required for Activation of Epithelial Cell Proinflammatory Responses *Infect Immun.* 2011;79(12):4902-4911.
23. Sarazin A, Poulain D, Jouault T., In vitro pro- and anti-inflammatory responses to viable *Candida albicans* yeasts by a murine macrophage cell line. *Med Mycol.* 2010;48(7):912-921.
24. Aydın M., *Candida* cinsi mantarlar (*Candida albicans*), Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji Konu 133.2004; Sa:1109-1118.
25. Kuştimur S., *Kandida* patogeneğinde rol oynayan faktörler, *Mikrobiyol Bült.*, 1994; 28:175-181.
26. Matthews R, Burnie J., The epidemiology and pathogenesis of candidiasis: Applications in prevention and treatment. *Bull Inst Pasteur.* 1998;96(4):249-256.
27. Pfaller MA, Grant C, Morthland V, Rhine-Chalberg J., Comparative evaluation of alternative methods for broth dilution susceptibility testing of fluconazole against *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 1994;32(2):506-509.
28. Yücel A, Kantarcıoğlu AS., Pathogenicity determinants of *Candida*., *Cerrahpaşa J Med* 2000; 31 (3): 172-186.
29. Çerikçioğlu N., *Kandida* enfeksiyonlarının immünolojisi, *İnfeksiyon Dergisi*, 2007, cilt 21, sayı 0, sayfa:055-061.

30. Reiss E, Hearn VM, Poulain D, Shepherd MG., Structure and function of the fungal cell wall. *J Med Vet Mycol Bi-Mon Publ Int Soc Hum Anim Mycol.* 1992;30 Suppl 1:143-156.
31. Kantarcioğlu S.A., Yücel A., *Candida albicans*'da mannan: çeşitli özellikleri ve önemi, *Cerrahpaşa J Med*, 2004;35:1-11.
32. Martínez JP, Gil ML, López-Ribot JL, Chaffin WL. Serologic Response to Cell Wall Mannoproteins and Proteins of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(1):121-141.
33. Gil ML, Casanova M, Martínez JP, Sentandreu R., Antigenic cell wall mannoproteins in *Candida albicans* isolates and in other *Candida* species. *J Gen Microbiol.* 1991;137(5):1053-1061.
34. Nelson RD, Shibata N, Podzorski RP, Herron MJ., *Candida* mannan: chemistry, suppression of cell-mediated immunity, and possible mechanisms of action., *Clin Microbiol Rev.* 1991;4(1):1-19.
35. Marconi P, Scaringi L, Tissi L, et al. Induction of natural killer cell activity by inactivated *Candida albicans* in mice. *Infect Immun.* 1985;50(1):297-303.
36. Sentandreu R, Herrero E, Martinez JP, Elorza MV., Yeast Cell Wall Glycoproteins. In: Latgé JP, Boucias D, eds. *Fungal Cell Wall and Immune Response.* NATO ASI Series. Springer Berlin Heidelberg; 1991:229-239.
37. Latge, J.P., Boucias, Drion, Fungal cell wall and immune response, Proceeding of the NATO Advanced Research Workshop on Fungal Cell Wall and Immune Response, held in Eloudia, Greece, September 29–October 5, 1990.
38. Kocourek J, Ballou CE., Method for Fingerprinting Yeast Cell Wall Mannans., *J Bacteriol.* 1969;100(3):1175-1181.
39. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D., New Enzyme Immunoassays for Sensitive Detection of Circulating *Candida albicans* Mannan and Antimannan Antibodies: Useful Combined Test for Diagnosis of Systemic Candidiasis. *J Clin Microbiol.* 1999;37(5):1510-1517.
40. Casadevall A., Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect Immun.* 1995;63(11):4211-4218.
41. Sendid B, Poirot JL, Tabouret M, et al., Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *J Med Microbiol.* 2002;51(5):433-442.
42. Scaringi L, Marconi P, Boccanera M, Tissi L, Bistoni F, Cassone A., Cell Wall Components of *Candida albicans* as Immunomodulators: Induction of Natural Killer and Macrophage-mediated Peritoneal Cell Cytotoxicity in Mice by Mannoprotein and Glucan Fractions. *J Gen Microbiol.* 1988;134(5):1265-1274.
43. Matthews RC., Pathogenicity determinants of *Candida albicans*: potential targets for immunotherapy? *Microbiology.* 1994;140(7):1505-1511.

44. McCullough MJ, Ross BC, Reade PC., *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation., *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1996;25(2):136-144.
45. Kirkpatrick CH., Host factors in defense against fungal infections. *Am J Med.* 1984;77(4D):1-12.
46. Roitt's Essential Immunology 10th ED, Accessed September 11, 2013.
47. Domer JE, Garner RE., Immunomodulation in response to *Candida*., *Immunol Ser.* 1989; 47:293-317.
48. Shoham S, Levitz SM., The immune response to fungal infections., *Br J Haematol.* 2005;129(5):569-582.
49. Bell DY, Haseman JA, Spock A, McLennan G, Hook GE., Plasma proteins of the bronchoalveolar surface of the lungs of smokers and nonsmokers. *Am Rev Respir Dis.* 1981;124(1):72-79.
50. Skaleric U, Zajsek P, Cvetko E, Lah T, Babnik J., Alpha 2-macroglobulin in gingival fluid: correlation with alveolar bone loss in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1986;13(9):833-836.
51. Pejovic M, Stankovic A, Mitrovic DR., Determination of the apparent synovial permeability in the knee joint of patients suffering from osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1995;34(6):520-524.
52. Plusa T, Tchórzewski H., Analysis of proteolytic enzymes and their natural inhibitors in serum and bronchial lavage fluid in atopic bronchial asthma, chronic bronchitis and pneumonia. *Allerg Immunol (Leipz).* 1985;31(3):169-178.
53. Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, et al., Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet.* 1998;19(4):357-360.
54. De Boer JP, Creasey AA, Chang A, et al., Alpha-2-macroglobulin functions as an inhibitor of fibrinolytic, clotting, and neutrophilic proteinases in sepsis: studies using a baboon model. *Infect Immun.* 1993;61(12):5035-5043.
55. Bergqvist D, Nilsson IM., Hereditary alpha 2-macroglobulin deficiency. *Scand J Haematol.* 1979;23(5):433-436.
56. Feldman R.S., Gonias L.S., Pizzo V.S., Model of α 2-macroglobulin structure and function, *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1985; 82: 5700-5704.
57. Chu CT, Pizzo SV., Alpha 2-Macroglobulin, complement, and biologic defense: antigens, growth factors, microbial proteases, and receptor ligation. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 1994;71(6):792-812.
58. Kristensen T, Moestrup SK, Gliemann J, Bendtsen L, Sand O, Sottrup-Jensen L., Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the alpha 2-macroglobulin receptor. *FEBS Lett.* 1990;276(1-2):151-155.

59. Ashcom JD, Tiller SE, Dickerson K, Cravens JL, Argraves WS, Strickland DK., The human alpha 2-macroglobulin receptor: identification of a 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of alpha 2-macroglobulin. *J Cell Biol.* 1990;110(4):1041-1048.
60. Misra UK, Chu CT, Gawdi G, Pizzo SV., The relationship between low density lipoprotein-related protein/alpha 2-macroglobulin (alpha 2M) receptors and the newly described alpha 2M signaling receptor. *J Biol Chem.* 1994;269(28):18303-18306.
61. Misra UK, Chu CT, Gawdi G, Pizzo SV., Evidence for a second alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem.* 1994;269(17):12541-12547.
62. Barrett J.A., Brown A.M., Sayers A.C., The electrophoretically slow and fast forms of the α 2-macroglobulin molecule, *Biochem. J.*, 1979; 181, 401-418.
63. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ., Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997;324 (Pt 1):1-18.
64. Stadtman ER., Protein oxidation and aging. *Science*, 1992;257(5074):1220-1224.
65. Weiss SJ., Tissue destruction by neutrophils, *N Engl J Med.* 1989;320(6):365-376.
66. Wu SM, Patel DD, Pizzo SV., Oxidized alpha2-macroglobulin (alpha2M) differentially regulates receptor binding by cytokines/growth factors: implications for tissue injury and repair mechanisms in inflammation, *J Immunol Baltim Md* 1950. 1998;161(8):4356-4365.
67. Wu SM, Pizzo SV. alpha(2)-Macroglobulin from rheumatoid arthritis synovial fluid: functional analysis defines a role for oxidation in inflammation, *Arch Biochem Biophys.* 2001;391(1):119-126.
68. Djeu JY, Blanchard DK, Richards AL, Friedman H., Tumor necrosis factor induction by *Candida albicans* from human natural killer cells and monocytes, *J Immunol.* 1988;141(11):4047-4052.
69. Wojdani A, Ghoneum M., In vivo augmentation of natural killer cell activity by *Candida albicans*. *Int J Immunopharmacol.* 1987;9(7):827-832.
70. Bistoni F, Vecchiarelli A, Cenci E, Puccetti P, Marconi P, Cassone A., Evidence for macrophage-mediated protection against lethal *Candida albicans* infection. *Infect Immun.* 1986;51(2):668-674.
71. Cenci E, Romani L, Vecchiarelli A, Puccetti P, Bistoni F., T cell subsets and IFN-gamma production in resistance to systemic candidosis in immunized mice, *J Immunol.* 1990;144(11):4333-4339.
72. Sinha BK, Prasad S, Monga DP., Studies of experimental candidiasis in T-cell-deficient mice. *Zentralblatt Für Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene Ser Medizinische Mikrobiologie Infektionsdisseminologie Parasitologie.* 1987;265(1-2):203-209.

73. Kondori N1, Edebo L, Mattsby-Baltzer I., *Candida albicans* cell wall antigens for serological diagnosis of candidemia, *Med Mycol.* 2003 Feb;41(1):21-30.
74. Dixon DM, Casadevall A, Klein B, Mendoza L, Travassos L, Deepe GS Jr., Development of vaccines and their use in the prevention of fungal infections. *Med Mycol.* 1998;36 Suppl 1: 57-67.
75. Held J, Kohlberger I, Rappold E, Grawitz AB, Häcker G., Comparison of (1→3)- β -d-Glucan, Mannan/Anti-Mannan Antibodies, and Cand-Tec *Candida* Antigen as Serum Biomarkers for Candidemia. *J Clin Microbiol.* 2013;51(4):1158-1164.
76. Ballou CE., Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol.* 1990;185:440-470.
77. Trinel PA, Faille C, Jacquinet PM, Cailliez JC, Poulain D., Mapping of *Candida albicans* oligomannosidic epitopes by using monoclonal antibodies. *Infect Immun.* 1992;60(9):3845-3851.
78. DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F., Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal Chem.* 1956;28(3):350-356.
79. Swenson RP, Howard JB., Structural characterization of human alpha2-macroglobulin subunits, *J Biol Chem.* 1979;254(11):4452-4456.
80. Wongtangprasert T, Natakathung W, Pimpitak U, et al., Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp, *J Zhejiang Univ Sci B.* 2014;15(2):165-172.
81. Sineh sepehr K, Baradaran B, Majidi J, Abdolalizadeh J, Aghebati leili, Zare Shahneh F., Mass-Production and Characterization of Anti-CD20 Monoclonal Antibody in Peritoneum of Balb/c Mice, *Adv Pharm Bull.* 2013;3(1):109-113.
82. Eloy O, Tabella C, Harzic M, et al., Detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful for diagnosis of deep seated candidiasis, *Ann Biol Clin (Paris).* 2002;60(6):711-714.
83. Moragues MD, Omaetxebarria MJ, Elguezabal N, et al., A Monoclonal Antibody Directed against a *Candida albicans* Cell Wall Mannoprotein Exerts Three Anti-*C. albicans* Activities. *Infect Immun.* 2003;71(9):5273-5279.
84. Nnalue NA, Weintraub A, Oscarson S, Lindberg AA., Cross-reactivity between the mannan of *Candida* species, *Klebsiella* K24 polysaccharide and *Salmonella* C1 and E O-antigens is mediated by a terminal non-reducing β -mannosyl residue. *Eur J Biochem.* 1994;220(3):973-979.
85. Shibata N, Arai M, Haga E, et al., Structural identification of an epitope of antigenic factor 5 in mannans of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) and J-1012 (serotype A) as beta-1,2-linked oligomannosyl residues. *Infect Immun.* 1992;60(10):4100-4110.

86. Han Y, Ulrich MA, Cutler JE., *Candida albicans* mannan extract-protein conjugates induce a protective immune response against experimental candidiasis. *J Infect Dis.* 1999;179(6):1477-1484.
87. Abacı Ö., Haliki Uztan A., *Candida albicans* ve Quorum-Sensing Molekülleri, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR* , 2010; Cilt: 08 Sayı: 1 Sayfa: 44-49.
88. Johnson MA, Cartmell J, Weisser NE, Woods RJ, Bundle DR., Molecular Recognition of *Candida albicans* (1→2)-β-Mannan Oligosaccharides by a Protective Monoclonal Antibody Reveals the Immunodominance of Internal Saccharide Residues, *J Biol Chem.* 2012;287(22):18078-18090.
89. Xu H, Nobile CJ, Dongari-Bagtzoglou A., Glucanase Induces Filamentation of the Fungal Pathogen *Candida albicans*, *PLoS ONE.* 2013;8(5).
90. Bates S, Hall RA, Cheetham J, et al., Role of the *Candida albicans* MNN1 gene family in cell wall structure and virulence, *BMC Res Notes.* 2013;6:294.
91. Köhler G, Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495-497.
92. Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, et al., Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Med.* 2014;40(9):1303-1312.
93. Paramythiotou E, Frantzeskaki F, Flevari A, Armaganidis A, Dimopoulos G., Invasive Fungal Infections in the ICU: How to Approach, How to Treat. *Molecules.* 2014;19(1):1085-1119.
94. Schell WA, Benton JL, Smith PB, et al., Evaluation of a digital microfluidic real-time PCR platform to detect DNA of *Candida albicans* in blood, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2012;31(9):2237-2245.
95. Koyama T, Makita M, Shibata N, Okawa Y., Influence of oxidative and osmotic stresses on the structure of the cell wall mannan of *Candida albicans* serotype A, *Carbohydr Res.* 2009;344(16):2195-2200.
96. Polonelli L, Beninati C, Teti G, et al., Yeast killer toxin-like candidacidal Ab6 antibodies elicited through the manipulation of the idiotypic cascade, *PloS One.* 2014;9(8):e105727.
97. Kavishwar A, Shukla PK., Candidacidal activity of a monoclonal antibody that binds with glycosyl moieties of proteins of *Candida albicans*. *Med Mycol.* 2006;44(2):159-167.

EKLER

EK1: Etik Kurul Kararı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :01/08/2012
TOPLANTI NO :2012-16
DOSYA NO :2012-74
KARAR NO :2012-16-104






Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Haluk Ataoğlu'nun araştırma yürütücüsü olduğu ve Prof.Dr.Haluk Ataoğlu, Cevahir Altınkaynak ve Gülizar Aydoğdu'nun ortak çalışmaları olan "Candida albicans ve diğer maya mantarlarının hücre duvar fizyolojisinin değişik monoklonal ve poliklonal antikolar ile araştırılması ve immün sistemle etkileşimlerinin gösterilmesi" başlıklı çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışmanın Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre;

- Uygun bulunarak onaylanmasına,
 Düzeltilmesine,
oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Uzm.Vet.Hek.Attıla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	

- Uygun bulunarak onaylanmıştır.
 Düzeltülmesina,
oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Ünvanı	İmza
Prof.Dr.Öğuz SARIMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Eyüp Sabit AKARSLI (Başkan Vekili)	Tıp Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tezgin ÖZCELİKAY (Üye)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılar Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YIGİT (Üye)	Zootekni Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Faah CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAÇLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Cevahir ALTINKAYNAK
Doğum Yeri : Kayseri
Doğum Tarihi : 31/03/1983
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Yüksek Lisans :Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya ABD.
Lisans :Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Kimya Bölümü, Ankara

İş Tecrübesi

- ❖ TÜBİTAK TEYDEB İş Rehberliği;
Proje Adı: 2130195- Medikal ve Kozmetik Alanda Kullanılan Terapötik Proteinlerin Endüstriyel Boyutta Üretilmesi ve Cilt Bakım Ürünleri Geliştirilmesi, Doku Biyoteknoloji Limited Şirketi, 01/01/2014-31/12/2014.
- ❖ TÜBİTAK TEYDEB İş Rehberliği;
Proje Adı: 2130143- Zor Örneklerden PZR İçin Primer Tasarım Destekli DNA İzolasyon Kiti,
Eres Biyoteknoloji Mühendislik Bilişim Medikal Eğitim Turizm Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi, 01/01/2014-31/12/2014.
- ❖ Matriks Biyoteknoloji Sanayi ve Ticaret Ltd.Şti, Ankara, Şirket Müdürü, 18 Ekim 2010-devam ediyor.
- ❖ Matriks Biyoteknoloji Sanayi ve Ticaret Ltd.Şti, Ankara, AR-GE uzmanı, 27 Haziran 2010 – Ekim 2010.
- ❖ Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Hibridoma bilim dalı, Araştırma Asistanı, Şubat 2010- Nisan 2013.
- ❖ Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Proteom bilim dalı, Araştırma Asistanı, 2008-Şubat 2010.

- ❖ Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Genel Kimya Laboratuvar Uygulama Ders Asistanı, 2007- 2008.

Yayınlar

Aydın C., Ataoğlu H., *Candida albicans* Maya Hücre Duvarında Eksprese Edilip Hif Duvarında Edilmeyen β -1,2 Mannan Yapılarının Monoklonal Antikorlar İle Gösterilmesi, Mikrobiyol Bul 2015; 49(1):66-76.

Projeler

- 1) Crohn Hastalığının, Ülseratif Kolitten ayırıcı tanısı ve etyolojinin aydınlatılması için yeni immünolojik belirteçlerin (marker) geliştirilmesi ve validasyonu, Gazi Üniversitesi Teknopark, (AR-GE), 27/01/2014-27/01/2016.
- 2) Değişik kanser türlerinin tedavisinde, anjiogenezi bloke ederek etki eden *Bevacizumab* monoklonal antikorunun kan düzeyini ve ilaca karşı oluşan antikorları gösteren ELİSA test kitlerinin araştırma ve geliştirme projesi, Kosgeb Ar-Ge İnovasyon Destek Programı, (Proje Yürütücüsü), 10/02/2012-23/10/2013.
- 3) Alfa-2-makroglobulin' in farklı fiziksel formlarının inflamasyondaki rolü, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi, (Araştırmacı), 25/11/2011-16/01/2013.
- 4) Meme Kanserli Olguların Proteomik Yöntemler ile protein profillerinin değerlendirilmesi, TÜBİTAK/ TBAG/1002 projesi, 209T146, (Araştırmacı), 2010-2011.
- 5) Genetik Absans Epilepsili WAG/Rij Sıçanlarda Epileptogenez Sürecinin, Absans ve Limbik Epilepsi Örneklerinde, Bölgesel ve Moleküler Düzeyde Proteomiks Yöntemi ile Araştırması, TÜBİTAK/ SBAG-1001 projesi, 108 S 196, (Bursiyer), 2009-2011.
- 6) Prothrombin G20210a Gen Değişiminin Plazma Proteinleri Üzerine Etkisinin Proteomik Analizler İle Değerlendirilmesi, Ankara Üniversitesi BAP, (Araştırmacı), 01/03/2008-04/08/2010.
- 7) Sağlıklı ve meme kanseri hastası kadınların (tedavi almamış, tedavi alan ve tedavi olmuş) serum proteinleri değişiminin 2-D (İki Boyutlu) elektroforez ile tespiti, Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu Destekli, B927(Araştırmacı), 2009-2010.

- 8) N-izopropilakrilamit bazlı polimerik nano kürelerin hazırlanması karakterizasyonu ve gen taşınımı amacıyla kullanılabilirliklerin araştırılması, Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu Destekli, B450 (Araştırmacı), 2008-2009.

Kongre, Sempozyum, Çalıştay ve Toplantı

1. Multidisipliner Araştırma Eğitimi Günleri, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara. 8-9/03/2014.
2. 9. Ankara Biyoteknoloji günleri, 17-18/10/2011.
3. 8. Ankara Biyoteknoloji günleri, 08-10/11/2010.
4. I.Ulusal Genetik ve Biyoteknoloji Çalıştayı, 12-13 Şubat 2010, Kayseri.
5. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, I.Biyoteknoloji Araştırma ve Kariyer Günü, (25.05.2009), “Sağlıklı ve Meme Kansерli Kadınların Serum Proteinlerinin Karşılaştırmalı Proteom Analizi”
6. International Enzyme Engineering Symposium–2008, Ege Üniversitesi/Erzincan Üniversitesi, 01–05/10/2008, Kuşadası.

Eğitimler

- 1) “Firmaların Uluslararasılaşmasında Ürün İnovasyonunun Yeri ve Teknolojik Ürünün Ticarileşmesi” Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı (TTGV), Gazi Teknoloji Transfer Ofisi (Gazi TTO) ve Gazi Teknopark işbirliği ile Avrupa İşletmeler Ağı (Enterprise Europe Network-EEN), 03-04 Aralık 2014. Eğitimci; Timuçin Bayraktar ve Deniz Noyan.
- 2) “TEB Girişim Bankacılığı işbirliği ile BÜYÜME VE FİNANSMAN YÖNETİMİ” eğitimi, 06/11/2014, Eğitimci; Taner Baltacı.
- 3) Rehber Ortak Sağlık Güvenlik Birimi ve Çevre Denetim Hiz. Ltd.Şti, “Temel İş Sağlığı ve Güvenliği” eğitimi, 02/04/2013.Sertifika No: 1304-02.
- 4) Orta Anadolu İhracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği, “Dış Ticaret Eğitim Programı”, 02/07/2012.
- 5) Turcert Belgelendirme Hizmetleri Limited Şirketi, “ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi” dokümantasyon eğitimi, 14-15/04/2012. Sertifika No: 2012-3054.
- 6) Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet ÖZSÖZ denetiminde “Nükleik Asit Temelli

Biyosensörler” konusunda uygulamalı Eğitim, 20–24.07.2009,Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim dalı Araştırma Laboratuvarı.

- 7) PF-2DE Kromatografi sistemi, Beckman Coulter cihaz eğitimi, Nisan 2009, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı
- 8) Bio-Rad Protean IEF sistemi,Bio-Rad Biologic DuoFlow Kromatografi sistemi, Bio-Rad SpotCutter sistemi, Bio-Rad Versadoc 1000 jel görüntüleme sistemi, Bio-Rad PDQuest Software jel analiz sistemi
Bio-Rad/Medtek cihaz eğitimi, Mart 2009, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı
- 9) “Metabolizmanın Regülasyonu ve Metabolik Regülasyon” Lisansüstü Yaz okulu, 29.06–6.07.2008, Trabzon.
- 10) “İki Boyutlu Jel Elektrofrez ile Proteom Analizi” 17–19.10.2007, Ankara Üniversitesi

Tezler

- 1) Yüksek Lisans, Cevahir Altınkaynak, Sağlıklı ve meme kanseri hastası kadınların (tedavi almamış, tedavi alan ve tedavi olmuş) serum proteinleri değişiminin 2-D (iki boyutlu) elektrofrez ile tespiti, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, 2010. (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Proteom Bilim Dalı işbirliğinde)

Ödüller

- 1) Ankara Üniversitesi; I.Biyoteknoloji Araştırma ve Kariyer Günü’nde (25.05.2009),
“Sağlıklı ve Meme Kanseri Kadınların Serum Proteinlerinin Karşılaştırmalı Proteom Analizi” isimli poster sunumu ile ikincilik ödülü.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1. BIOTECHMETU_27–30 September 2009, Middle East Technical University, Ankara, Turkey.

“Comparative Proteom Analysis of Serum Proteins on Healthy and Breast Cancer Women Using 2D-PAGE and MALDI-TOF” başlıklı poster sunumu.

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1. XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 13-16 Aralık 2009, Antalya. “Genetik Absans Epilepsili Wag/Rij Sıçanlarda Korteks Dokusunda Proinflamatuvar Sitokin Düzeylerinin Yaşa Bağlı Değişiminin Epilepsi Sürecine Etkisine Proteomik Yaklaşım” Sözlü sunum
2. XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 13-16 Aralık 2009, Antalya “Meme Kanserinde Afinite Kolonlu Subtraktif Proteomik Analizler ile Yeni Biyobelirteç Araştırılması” Sözlü sunum

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

Aydın C., Ataoğlu H., *Candida albicans* Maya Hücre Duvarında Eksprese Edilip Hif Duvarında Edilmeyen β -1,2 Mannan Yapılarının Monoklonal Antikorlar İle Gösterilmesi, Mikrobiyol Bul 2015; 49(1):66-76.

***Candida albicans* Maya Hücre Duvarında Eksprese Edilip Hif Duvarında Edilmeyen β -1,2 Mannan Yapılarının Monoklonal Antikorlar ile Gösterilmesi**

Demonstration of β -1,2 Mannan Structures Expressed on the Cell Wall of *Candida albicans* Yeast Form But Not on the Hyphal Form by Using Monoclonal Antibodies

Cevahir AYDIN^{1,2}, Haluk ATAÖĞLU²

¹ Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.

¹ Ankara University Institute of Biotechnology, Ankara, Turkey.

² Matriks Biyoteknoloji Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti., Gazi Teknopark, Ankara.

² Matriks Biotechnology Industry and Trade Ltd. Co., Gazi Teknopark, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 05.09.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 19.11.2014

ÖZ

Candida albicans, insanda hem kommensal hem de fırsatçı patojen olarak bulunabilen polimorfik bir maya mantarıdır. *Candida* hücre duvarının ana bileşenlerinden birisi olan mannan, mantar-konak ilişkisinde ve mayanın virülansında rol oynamaktadır. *C. albicans* enfeksiyonlarının gelişiminde, mikroorganizmanın maya formundan hif formuna geçiş yeteneği önem taşır. Hif formu, maya formunda olmayan çeşitli antijenik özelliklere sahiptir ve hif oluştuğunda hücre duvarında yapısal değişiklikler meydana gelir. Bu dönüşüm ile ilgili birçok faktör etkili olsa da, tam olarak yeterli bilgi mevcut değildir. Bu çalışmada, *C. albicans*'ın form değiştirdiğinde duvar yapısında yer alan mannanın konfigürasyon değişiminin monoklonal antikorlar kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada *C. albicans* (NIHA 207) serotip A suşu ile kontrol olarak benzer hücre duvar yapısına sahip *Salmonella choleraesuis* 211 ve *Salmonella infantis* suşları kullanılmıştır. *C. albicans*'ın maya formu, YEPD agar besiyerinde 28°C'de inkübasyon ile, hif formu ise YEPD buyyon besiyerinde çalkalamalı inkübatör üzerinde 37°C'de 3-4 saat inkübasyon ile üretilmiştir. Mannan içeriği, hücrelerin eksponansiyel fazda toplanıp yıkanmasından sonra, pelletin 20 mM sitrat tamponu ile süspanse edilip 125°C'de 90 dakika otoklavlanmasıyla elde edilmiştir. Monoklonal antikor üretimi için hibridoma yöntemi kullanılmış; Balb/C farelerinin antijen ile immünize edilmesinden sonra toplanan splenositlerin, F0 myeloma hücreleri ile füzyon oluşturması sağlanmıştır. HAT besiyeri içerisinde oluşan klonlar arasında hibrid hücrelerin ürettiği antikorlar ELISA yöntemi ile izlenmiştir. Antikorların izotip tayini, ticari bir kit (Pierce Biotechnology, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Monoklonal antikorları içeren kültür süpernatantları toplanmış ve amonyum sülfat çöktürme yöntemi ile saflaştırılmıştır. Deney reaksi-

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Haluk Ataoğlu, Matriks Biyoteknoloji Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti., Gazi Üniversitesi Teknoplaza Binası, BZ17, Gölbaşı, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 485 4294, **E-posta (E-mail):** halukataoglu@matriksbiotek.com

yonlarının tespitinde sandviç ELISA ve immüno Floresans (IF) yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmamızda, 2B7 klonu tarafından üretilen ve *C.albicans* maya hücre duvarına karşı özgüllüğü yüksek olan IgM sınıfından monoklonal antikorlar (mAb-2B7) elde edilmiştir. Bu antikorların, *C.albicans*'a benzer hücre duvar yapısına sahip bakterilerden *S.choleraesuis* 211 ve *S.infantis* suşları ile çapraz reaksiyon verdiği saptanmıştır. *C.albicans* maya formunda bulunan mannan β -1,2 bağının varlığı, bu bağlara özgül ticari bir monoklonal antikor (mAb-ACMK-1; Matriks Biotek®, Ankara) kullanılarak doğrulanmıştır. Ayrıca, mAb-ACMK-1'in IF yönteminde *C.albicans*'ın maya formu ile yüksek floresans verirken hif formu ile ışımaya vermediği izlenmiştir. İlk defa elde edilen bu veri, hif duvarında β -1,2 mannan bağlarının ya seyrek olarak bulunduğunu ya da hiç bulunmadığını göstermektedir. Her iki monoklonal antikorun da mannan antijenini tanınmasına rağmen, epitop özellikleri farklı olduğundan mAb-2B7 *S.choleraesuis* 211 ile reaksiyon verirken mAb-ACMK-1 aynı bakteri ile reaksiyon vermemiştir. Sonuç olarak monoklonal antikorlar, kandidaların antijenik yapılarının tanımlanmasına olanak sağlayacak, böylelikle serumda mannan varlığını tespit eden ticari testlerin duyarlılık ve özgüllüğünü artıracak yeni determinantların tespit edilmesi mümkün olabilecektir.

Anahtar sözcükler: *Candida albicans*; maya; hif; mannan; β -1,2 bağı; monoklonal antikor.

ABSTRACT

Candida albicans is a polymorphic fungus that may be observed as both commensal and opportunistic pathogen in humans. As one of the major components of *Candida* cell wall structure, mannan plays an important role in the fungus-host cell interaction and in virulence. The ability to switch from yeast to hypha form of microorganism is crucial in the development of *C.albicans* infections. Hyphal form has different antigenic properties compared to yeast form and structural changes occur in the yeast cell wall during transition from yeast to hypha form. Although there are several factors associated with this transition process, sufficient information is not available. The aim of this study was to investigate the change of configuration in mannan structure found in *C.albicans* cell wall by using monoclonal antibodies. *C.albicans* (NIHA 207) serotype A strains were used as test strains throughout the study, together with *Salmonella choleraesuis* 211 and *Salmonella infantis* as controls with similar cell wall structures to that of *C.albicans*. Cultures were maintained on YPD-agar medium by incubating at 28°C for yeast forms, and on YPD-broth medium in a shaking incubator at 37°C for 3-4 hours for the growth of hyphal forms. Cells were harvested in the exponential phase, and after being washed, the mannan content from *C.albicans* were extracted from pellet by heating in 20 mM sodium citrate buffer for 90 minutes at 125°C. Hybridoma technique was used for the production of monoclonal antibodies. After immunizing the Balb/C mice with antigen, the splenocytes were harvested and fusion was performed between spleen cells and F0 myeloma cells. The clones grown in HAT medium were screened for the presence of antibody producing hybrid cells by ELISA method. The antibody isotypes were determined by using a commercial kit (Pierce Biotechnology, ABD). The culture supernatants which contained monoclonal antibodies were collected and purified according to the ammonium sulphate method. Sandwich ELISA and immunofluorescence (IF) methods have been used to detect the experimental reactions. In our study, highly specific class IgM murine monoclonal antibodies (mAb-2B7) against *C.albicans* yeast cell wall were obtained from clone 2B7. These antibodies cross-reacted with *S.choleraesuis* 211 and *S.infantis* bacteria sharing similar cell wall structure of *C.albicans*. The existence of mannan β -1,2 bonds on the surface of *C.albicans* yeast form was confirmed with a commercial monoclonal antibody (mAb-ACMK-1; Matriks Biotek®, Turkey) specific for those bonds. Besides, mAb-ACMK-1 interacted with *C.albicans* yeast form and gave intense fluorescence (high positive reaction) in IF method, but no fluorescence (negative) was detected with hyphal form. This data, obtained for the first time with this study, indicates that the mannan β -1,2 bonds are either found infrequently or none in the fungal hyphal wall. Although both monoclonal antibodies recognize the mannan antigen, mAb-2B7 reacted with *S.choleraesuis* 211, while mAb-ACMK-1 did not, due to the difference of epitope specificity. In conclusion, monoclonal antibodies may facilitate the characterization of antigenic structures of *Candida*, which will lead for the identification of new determinants that may increase the sensitivity and specificity of commercial tests used for mannan detection in serum.

Keywords: *Candida albicans*; yeast; hypha; mannan; β -1,2 linkage; monoclonal antibody.

Bu amaçla çalışmamızda, *C.albicans*'ın form değiştirdiğinde duvar yapısında yer alan mannanın konfigürasyon değişiminin monoklonal antikorlar kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kullanılan Suşlar

Çalışmada *C.albicans* (NIHA 207) serotip A suşu kullanıldı ve YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) agar besiyerinde 28°C'de üretildi. *C.albicans* hif formu, suşun sıvı besiyerine 10 µg/ml yaş hücre olacak şekilde pasajlanması ve 37°C'de 3-4 saat çalkalama inkübatörde bekletilmesiyle elde edildi. Kontrol olarak, benzer hücre duvar yapısına sahip *Salmonella choleraesuis* 211 ve *Salmonella infantis* suşları kullanıldı ve devamlılığı LB (Luria-Bertani) agar besiyerinde sağlandı. Koloniler 96°C'de su banyosunda 2 saat kaynatıldıktan sonra ELISA testi için kullanıldı.

Hücre Duvar Antijenlerinin Eldesi

C.albicans hücreleri, ekspanansiyel fazda toplandı. Bir kez %0.9 NaCl, bir kez de distile su ile yıkanarak hücre pelleti 20 mM sitrat tamponu (pH: 7.0) ile süspanse edildi. Mannan içeriği, Ballou'nun⁷ tanımladığı metoda göre 125°C'de 90 dakika otoklavlanarak ekstrakte edildi. Jelaniöz madde, 4°C'de 20 dakika 2500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant üzerine mannopteinin çöktürülmesi için 3 hacim %100 metanol ilave edildi ve 24 saat 4°C'de manyetik karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Presipitat toplandı, distile suda çözüldü ve ardından 4°C'de 24 saat boyunca distile suya karşı (3 kez su değiştirilerek) diyaliz edildi. Karbonhidrat içeriği fenol sülfirik asit yöntemine göre tayin edildi⁸. Elde edilen mannan kompleksi liyofilize edildi.

Candida Alkalın Ekstraksiyonu (CAE)

C.albicans hücreleri, ekspanansiyel fazda toplandı ve besiyerinden ayrıldı. 500 µl 1.85 M NaOH ve %5 merkaptotanol ilave edilerek 15 dakika buzda bekletildi. Ardından 500 µl %50 TCA (trikloroasetik asit) ilave edilerek 15 dakika buzda bekletildi. 3500 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı. Pellet üzerine 0.13 ml %75 gliserol, 0.23 ml distile su ve 0.08 ml %25'lik SDS (sodyum dodesil sülfat) solüsyonu konuldu; 5 dakika 96°C'de su banyosunda kaynatıldı. Kaynama sonrası 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant toplandı⁹. 1 M TrisCl (pH: 8.8) çözeltisi ile titre edilerek pH 7.4'e ayarlandıktan sonra 24 saat PBS'e karşı (3 kez su değiştirilerek) diyaliz edildi. Protein tayini Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, ABD) protokolüne uygun olarak yapıldı. Karbonhidrat tayini ise fenol sülfirik asit yöntemine göre yapıldı⁸.

Hibridoma Yöntemi ve Monoklonal Antikorların Üretilmesi

Hibridoma yönteminde kullanılacak olan immün hücrelerin eldesi için, 6 haftalık (25-30 g) 7 adet Balb/C fare kullanıldı. İmmünizasyon evresinde fareler; ilk dozda tam Freund adjuvanı, diğer dozlarda ise tam olmayan Freund adjuvanı ile birlikte 750, 1500 ve 3000 µg yaş hücre/hayvan olacak şekilde, sırasıyla bir gün arayla haftada üç gün

intraperitoneal yolla 6 ay immünize edildi. Antijene karşı oluşan immün yanıt ELISA ile izlendi. Son enjeksiyondan sonra farenin dalağı alındı. Hücre füzyonu, Kohler ve Milstein'in¹⁰ metodu referans alınarak gerçekleştirildi. Kısaca, splenositler ile F0 myeloma hücreleri arasında, %50 PEG solüsyonu (Sigma) varlığında füzyon oluşturuldu ve hücre süspansiyonu HAT (hipoksantin, aminopterin, timidin) besiyeri içerisinde 96 kuyulu plaklara yayıldı. Plaklar 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi ve bir hafta sonra HAT besiyeri (Sigma), HT besiyeri (Sigma) ile değiştirildi. İki hafta boyunca besiyerinde gelişen hibridoma kültür süpernatantları, uygun antikorları üretmeleri yönünden ELISA ile izlendi. Toplamda 480 adet kuyu tarandı ve antijene özgül monoklonal antikorlar seçildi. Antikorların izotip tayini, ImmunoPure Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Pierce Biotechnology, ABD) protokolüne uygun olarak yapıldı. Monoklonal antikorları içeren kültür süpernatantları toplandı ve amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle %35 (w/v) oranında saflaştırıldı.

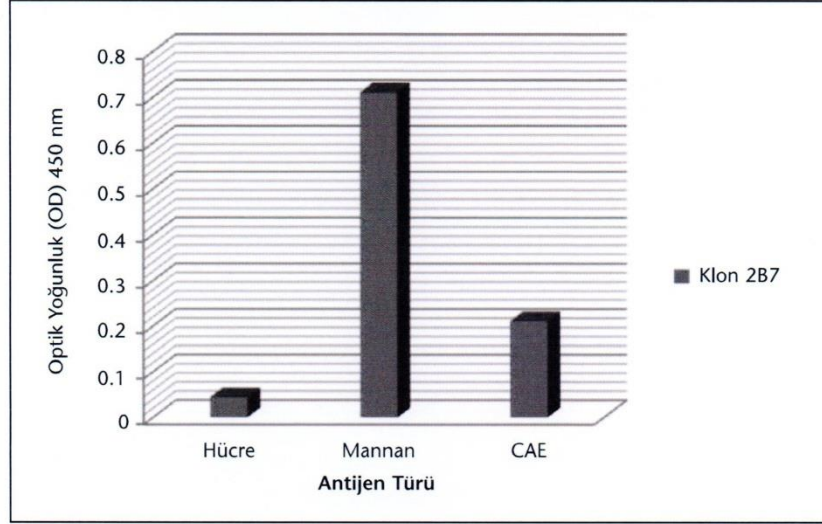
Çalışmada ayrıca, mannan yapısının β -1,2 başına özgül olan ticari monoklonal antikorlar (ACMK-1; Matriks Biotek®, Ankara) kullanıldı.

ELISA Yöntemi

Mikroplak kuyuları; 100 µg hücre/ml ve 20-70 µg protein/plak konsantrasyonu olacak şekilde, 0.05 M Na₂CO₃/HCO₃ (pH: 9.6) kaplama solüsyonu ile her kuyuda 100 µl hacim şeklinde kaplandı. Plağın üzeri kapatılarak 4°C'de 24 saat inkübe edildi. Ertesi gün çıkarılan mikroplak 1 saat oda ısısında bekletildi ve yıkama tamponuyla (PBS - %0.5 Tween 20) 3 kez yıkandı. Her kuyuya 200 µl blokama ajanı [1x Stabil Coat (SurModics Inc, ABD) 100:1 FCS, PBS-Tween 20 içerisinde] eklendi ve üzeri kapatıldıktan sonra 30 dakika 37°C'de, ardından 30 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildi. Süre bitiminde plakların içi aspire edildi. Primer antikor olarak, IgM izotipindeki 2B7 ve ACMK-1 monoklonal antikorları ayrı ayrı 100 µl/kuyu şeklinde dağıtıldı ve 2 saat çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Daha sonra plaklar 3 kez yıkanarak her kuyuya sekonder antikorlar (anti-fare IgM; 2500:1) 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Çalkalayıcı üzerinde 45 dakika inkübe edildi ve sonra yıkama işlemi aynı koşullarda tekrarlandı. Plaklara TMB substratından 100 µl/kuyu şeklinde ilave edildi; 10-15 dakika karanlık ortamda oda ısısında bekletildikten sonra 1 M H₂SO₄ çözeltisinden 50 µl/kuyu şeklinde ilave edildi. Sonuçlar 450 nm'de spektrofotometrik olarak okundu ve eşik (cut-off) değerinden yüksek olan örnekler pozitif olarak değerlendirildi [Eşik değer = Ortalama negatif kontrol + (Standart sapma negatif kontrol)²].

İmmüno Floresans (IF) Yöntemi

Bu amaçla kullanılacak olan lam kuyuları önce sırayla 20 µl distile su, %70 etil alkol ve tekrar distile su ile yıkandı. Kuyulara 20 µl Poly-L-Lysine (Sigma, P1524) konularak bekletildi ve çekildi. Paraformaldehit ile fikse edilmiş hücreler 100-200 µg/10 ml PBS şeklinde hazırlandı ve lam kuyularına 20'şer µl konuldu. Kuruması beklendikten sonra kuyulara primer antikorlar eklendi ve 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda PBS ile yıkama yapıldı ve bu kez floresan ile işaretli sekonder antikorlar [anti-fare IgM-FITC



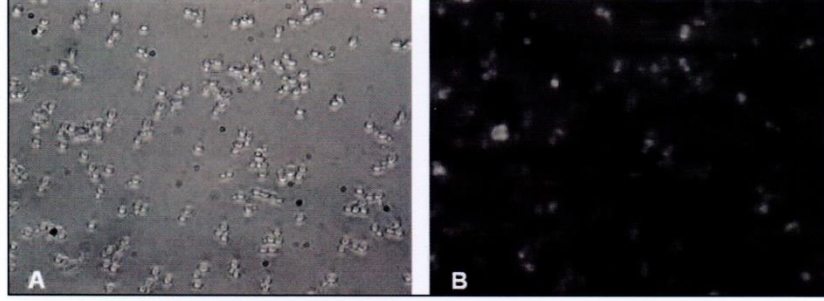
Şekil 2. ELISA yöntemi ile saptanan mAb-2B7 antikor düzeyleri (Grafik, OD değerlerinden eşik değerleri çıkarıldıktan sonra oluşturulmuştur. Eşik değerleri; hücre için 0.358, mannan için 0.539 ve CAE için 0.263'dür).

(2500:1)] ilave edilip 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra PBS ile yavaşça yıkanan lam kuyuları üzerine gliserol damlatılarak lamel ile kapatıldı ve floresan mikroskopta değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, *C.albicans*'a karşı yüksek özgüllükte monoklonal antikorlar (mAb-2B7) elde edilmiş ve bu antikorlar *C.albicans* maya formu ile IF yönteminde pozitif reaksiyon vermiştir (Şekil 2, Resim 1). Bu antikorlar, benzer yapıdaki bakteriler kullanılarak test edildiğinde, mAb-2B7'nin, hücre duvar yapısı lineer formda β -1,2 mannandan oluşan *S.choleraesuis* 211 ve *S.infantis* ile pozitif yanıt verdiği izlenmiştir (Tablo I).

β -1,2 bağına özgül monoklonal antikorlar (mAb-ACMK-1) ile yapılan değerlendirmede; bu antikorların ELISA yönteminde *C.albicans* maya formu ve CAE ile pozitif reaksiyon verdiği belirlenmiştir (Tablo II). Bunun yanında mAb-ACMK-1, IF yönteminde maya formu ile ışımaya verirken hif formu ile vermemiştir (Resim 2,3). Bu durum, β -1,2 bağılı mannanın, maya hif yaptığıında morfolojide meydana gelen değişiklik nedeniyle hif uzantılarında görünmediğini ortaya koymuştur. Bu antikorlar, *S.choleraesuis* 211 bakterisi kullanılarak test edildiğinde; mAb-ACMK-1'in dallanmış β -1,2 mannan duvar yapısı olan *C.albicans* ile pozitif yanıt verirken, lineer β -1,2 mannan duvar yapısı olan *S.choleraesuis* 211 ile yanıt vermediği saptanmıştır (Tablo III).

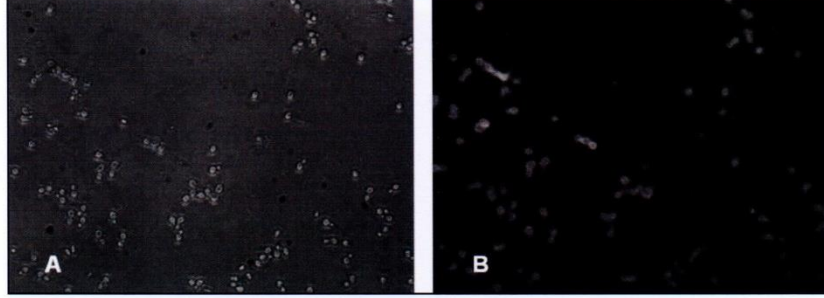


Resim 1. *C.albicans* maya formunun; A) Faz kontrast mikroskobu, B) Floresan mikroskobu görüntüsü (Klon 2B7 süpernatanı primer antikor olarak kullanılmıştır).

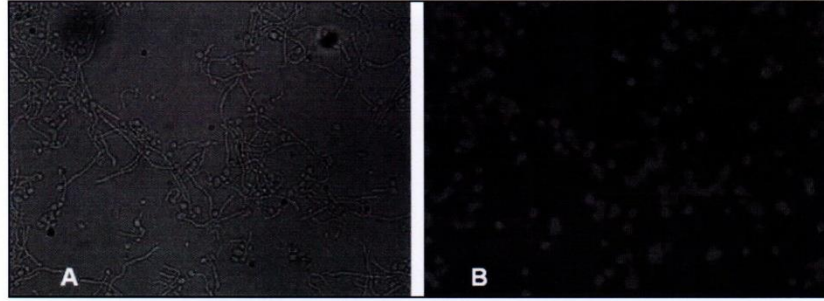
Plağın kaplandığı antijen	<i>S.choleraesuis</i> 211 hücre (100 μ g/ml)	<i>S.infantis</i> hücre (100 μ g/ml)
Primer antikor	2B7 süpernatanı	2B7 süpernatanı
Sekonder antikor	Anti-fare IgM (2500:1)	Anti-fare IgM (2500:1)
Yanıt (OD değeri)	2.429	2.070
Kör (Blank) değeri	0.244	0.221

Plağın kaplandığı antijen	<i>C.albicans</i> hücre (100 μ g/ml)	CAE (15 μ g/plak)
Primer antikor	ACMK-1 mAb (8000:1)	ACMK-1 mAb (8000:1)
Sekonder antikor	Anti-fare IgM (2500:1)	Anti-fare IgM (2500:1)
Yanıt (OD değeri)	0.972	0.560
Kör (Blank) değeri	0.279	0.238

Plağın kaplandığı antijen	<i>S.choleraesuis</i> 211 hücre (100 μ g/ml)	<i>C.albicans</i> hücre (100 μ g/ml)
Primer antikor	ACMK-1 mAb (8000:1)	ACMK-1 mAb (8000:1)
Sekonder antikor	Anti-fare IgM (2500:1)	Anti-fare IgM (2500:1)
Yanıt (OD değeri)	0.187	0.972
Kör (Blank) değeri	0.279	0.279



Resim 2. *C. albicans* maya formunun; A) Faz kontrast mikroskopu, B) Floresan mikroskopu görüntüsü (mAb-ACMK-1 primer antikor olarak kullanılmıştır).



Resim 3. *C. albicans* hif formunun; A) Faz kontrast mikroskopu, B) Floresan mikroskopu görüntüsü (mAb-ACMK-1 primer antikor olarak kullanılmıştır).

TARTIŞMA

Candida türü mayalar hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenlerinden olup, çoğunlukla yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda görülmektedir¹¹. En sık etken olan *C. albicans* bu hastalarda derin doku invazyonu gösterir ve yaşamı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara neden olur¹². Yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden sistemik kandidiyazın önlenmesinde erken tanı ve uygun tedavi büyük önem taşımaktadır¹³.

Candida türlerinin hücre duvar yapısı, mantar-konak ilişkisinde ve virülansında çok önemlidir⁶. Bu durum in vivo/in vitro ve kendi içinde de farklı çoğalma koşullarına göre değişkenlik gösterir. Mannan yapının benzer olabilmesi için çoğalma koşullarının aynı olması gerekmektedir¹⁴. Sistemik ve derin enfeksiyonlarda ise *C. albicans*'ın hif yapma özelliği önemli virülans faktörlerinden birisidir. Bu çalışmada, *C. albicans*'ın form değiştirdiğinde duvar yapısındaki mannanın konfigürasyon değişiminin gösterilmesi planlanmış ve bu amaçla kullanılan *C. albicans* serotip A mannanı, antijenik yapısı nedeniyle serotip B'yi de kapsadığından dolayı tercih edilmiştir.

Serotip A'da, hem asitle modifiye olmuş β -1,2 bağlı mannan yapılar hem de serotip A'ya özgü aside dirençli β -1,2 dallanmaları yer almaktadır. Mannan yapısı, serolojik yanıtı oluşturan en önemli kandida antijeni olup, B hücrelerini, yardımcı T hücrelerinden bağımsız olarak, doğrudan aktive etmekte ve dolayısıyla sadece IgM yanıtına yol açmaktadır. Bilindiği gibi, timusa bağımsız (T-independent; TI) antijenlere karşı oluşan humoral immün yanıtta, immünooglobulin izotip değişimi ve bellek B hücre farklılaşması olmamakta, dolayısıyla IgM antikorları sınıf değiştirmemekte ve sekonder antikor yanıtı görülmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda, hibridoma seçimi yapılırken anti-fare IgM antikorları tercih edilmiştir. Eloy ve arkadaşları¹⁵ yaptıkları çalışmada, %100 özgüllük ve %86 duyarlılıkla IgM antikorlarının, anti-kandida antikorlarını saptamak için en iyi test sistemi olduğunu ifade etmişlerdir. Polonelli ve arkadaşlarının¹⁶ çalışmasında da, *C. albicans*'a karşı elde edilmiş monoklonal antikorlar (mAb K20) IgM izotipindedir.

C1 grubu *Salmonella*'ların (*S. choleraesuis* 211 ve *S. infantis*) hücre duvar yapısı, *C. albicans* ile benzerlik göstermektedir. *Candida* türlerinin mannanı, çeşitli bağlarla bağlı mannan moleküllerinden oluşur. *Salmonella* türlerinin O antijenleri ise tekrarlayan ünite-lerden oluşan lineer zincirlerden oluşur. Çalışmamızda elde edilen mAb-2B7 antikorları da, bu benzerlik nedeniyle *S. choleraesuis* 211 ve *S. infantis* ile çapraz reaksiyon vermiştir (Tablo I). Nnalve ve arkadaşları¹⁷ tarafından yapılan bir çalışmada da, *Candida* türlerinin mannanı ile *Klebsiella* K24 polisakkaridi ve *Salmonella* C1 ve EO-antijenleri arasında çapraz reaksiyon tespit edilmiştir.

C. albicans'ı diğer kandidalardan ayıran en önemli özelliklerden biri germ tüp oluşturmalarıdır. Bilindiği gibi faktör 5 serumu, aside duyarlı β -1,2 bağlı manno-oligosakkaride karşılık gelir⁶. Bununla birlikte mAb-ACMK-1, mannan yapısındaki β -1,2 bağına özgüdür. β -1,2 bağlı mannoz ünitelerinin daha antijenik yapıda olması nedeniyle buna karşı üretilen antikorların koruyuculuğu da yüksektir⁶. Bu durum, kandida enfeksiyonlarının önlenmesinde monoklonal antikorların kullanımını gündeme getirmiştir¹⁸⁻²². Nitekim Han ve arkadaşlarının¹⁸ çalışmasında, β -1,2 bağlı mannanlara karşı elde edilen monoklonal antikorların deneysel kandidiyaz ve vajinal enfeksiyonu önlediği gösterilmiştir. Kavishwar ve Shukla²¹ elde ettikleri G5 monoklonal antikorlarının, in vivo deney koşulları altında tedavi ve profilaktik kullanım için faydalı olduğunu bildirmişlerdir. Lee ve arkadaşları²², β -1,2 mannana özgül olarak geliştirilen IgM tipindeki monoklonal antikorlar ile flukonazol kombinasyonunun, sistemik kandidiyaza karşı etkili olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda *C. albicans* suşu, β -1,2 bağına özgül mAb-ACMK-1 ile hem ELISA hem de IF yönteminde pozitif sonuç vermiş ve bu durum *C. albicans* maya formu yüzeyinde β -1,2 bağının var olduğunu göstermiştir (Tablo II, Resim 2). Buna karşın *C. albicans* hif oluşturduğunda hücre duvar yapısında değişiklik meydana gelmektedir. Nitekim çalışmamızda da mAb-ACMK-1, *C. albicans*'ın maya formu ile floresans verirken, hif yapısıyla ışığa vermemiştir. İlk defa elde edilen bu veri, hif duvarında β -1,2 mannan bağlarının ya seyrek olarak bulunduğunu ya da hiç bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca, β -1,2 bağına özgül ACMK-1 monoklonal antikor, hücre duvarı lineer formda β -1,2 bağını içeren suşlardan *S. choleraesuis* 211 ile test edildiğinde çapraz reaksiyon vermemiştir (Tablo III). Çalışmamızda elde edilen her iki monoklonal antikorun da (ACMK-1 ve 2B7)

β -1,2 bağına tanınmasına rağmen, mAb-2B7'nin *S.choleraesuis* 211 ile reaksiyon verirken mAb-ACMK-1'in vermemesinin, epitop özelliklerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Sonuç olarak, *C.albicans*'ın hücre duvarı mannan yan zincirlerinin kimyasal yapısının ve antijenik özelliklerinin tanımlanması, patojenite mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli bir basamak teşkil etmektedir. Çalışmamızda elde edilen antikorlar ile, enfeksiyon sırasında dolaşımdaki mannan veya anti-mannan antikorların ELISA veya IF gibi test sistemlerinde geliştirilmesi ve bu antikorların in vitro/in vivo test ve tedavi yöntemlerinde denenmesi, bundan sonraki çalışma planımızı oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Johnson MA, Cartmell J, Weisser NE, Woods RJ, Bundle DR. Molecular recognition of *Candida albicans* (1→2)- β -mannan oligosaccharides by a protective monoclonal antibody reveals the immunodominance of internal saccharide residues. *J Biol Chem* 2012; 287(22): 18078-90.
2. Xu H, Nobile CJ, Dongari-Bagtzoglou A. Glucanase induces filamentation of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS One* 2013; 8(5): e63736.
3. Shibata N, Suzuki A, Kobayashi H, Okawa Y. Chemical structure of the cell-wall mannan of *Candida albicans* serotype A and its difference in yeast and hyphal forms. *Biochem J* 2007; 404(3): 365-72.
4. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. Pathogenicity determinants of *Candida*. *Cerrahpaşa J Med* 2000; 31(3): 172-86.
5. Bates S, Hall RA, Cheetham J, et al. Role of the *Candida albicans* MNN1 gene family in cell wall structure and virulence. *BMC Res Notes* 2013; 6: 294.
6. Shibata N, Kobayashi H, Suzuki S. Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2012; 88(6): 250-65.
7. Ballou CE. Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol* 1990; 185: 440-70.
8. DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956; 28(3): 350-6.
9. Trinel PA, Faille C, Jacquinet PM, Cailliez JC, Poulain D. Mapping of *Candida albicans* oligomannosidic epitopes by using monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1992; 60(9): 3845-51.
10. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256(5517): 495-7.
11. Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, et al. Worrying trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Med* 2014; 40(9): 1303-12.
12. Paramythiotou E, Frantzeskaki F, Flevari A, Armaganidis A, Dimopoulos G. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. *Molecules* 2014; 19(1): 1085-119.
13. Schell WA, Benton JL, Smith PB, et al. Evaluation of a digital microfluidic real-time PCR platform to detect DNA of *Candida albicans* in blood. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(9): 2237-45.
14. Koyama T, Makita M, Shibata N, Okawa Y. Influence of oxidative and osmotic stresses on the structure of the cell wall mannan of *Candida albicans* serotype A. *Carbohydr Res* 2009; 344(16): 2195-200.
15. Eloy O, Tabella C, Harzic M, Pina P, et al. Detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful for diagnosis of deep seated candidiasis. *Ann Biol Clin (Paris)* 2002; 60(6): 711-4.
16. Polonelli L, Beninati C, Teti G, et al. Yeast killer toxin-like candidacidal Ab6 antibodies elicited through the manipulation of the idiotypic cascade. *PLoS One* 2014; 9(8): e105727.

17. Nnalue NA, Weintraub A, Oscarson S, Lindberg AA. Cross-reactivity between the mannan of *Candida* species, *Klebsiella* K24 polysaccharide and *Salmonella* C1 and E O-antigens is mediated by a terminal non-reducing β -mannosyl residue. *Eur J Biochem* 1994; 220(3): 973-9.
18. Han Y, Ulrich MA, Cutler JE. *Candida albicans* mannan extract-protein conjugates induce a protective immune response against experimental candidiasis. *J Infect Dis* 1999; 179(6): 1477-84.
19. Han Y, Riesselman MH, Cutler JE. Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannotriose as an IgM protective antibody. *Infect Immun* 2000; 68(3): 1649-54.
20. Cutler JE. Defining criteria for anti-mannan antibodies to protect against candidiasis. *Curr Mol Med* 2005; 5(4): 383-92.
21. Kavishwar A, Shukla PK. Candidacidal activity of a monoclonal antibody that binds with glycosyl moieties of proteins of *Candida albicans*. *Med Mycol* 2006; 44(2): 159-67.
22. Lee JH, Jang EC, Han Y. Combination immunotherapy of MAb B6.1 with fluconazole augments therapeutic effect to disseminated candidiasis. *Arch Pharm Res* 2011; 34(3): 399-405.