



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ



**MİDEDE *CANDIDA* SPP. İÇİNDE
HELICOBACTER PYLORI VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

DERYA BİROL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İZMİR
2024**

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

**MİDEDE *CANDIDA* SPP. İÇİNDE
HELICOBACTER PYLORI VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI**

Derya BİROL

Danışman: Prof. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR

2. Danışman: Doç. Dr. Nalan Gülşen ÜNAL

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

Biyoloji Doktora Programı

İZMİR

2024

KABUL ONAY SAYFASI

Derya Birol tarafından Doktora Tezi olarak sunulan “Midede *Candida* spp. içinde *Helicobacter pylori* varlığının araştırılması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 07.08.2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR

.....

Raportör Üye: Prof. Dr. Ataç UZEL

.....

Üye : Prof. Dr. Hacı Halil BIYIK

.....

Üye : Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

.....

Üye : Doç. Dr. Esin POYRAZOĞLU ÇOBAN

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Midede *Candida spp.* içinde *Helicobacter pylori* varlığının araştırılması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

07 / 08 / 2024

Derya BİROL

ÖNSÖZ

Helicobacter pylori; midede gastrit, ülser ve intestinal metaplaziye, duodenumda ülser gibi gastrointestinal patolojilerine sebep olabilen mide kanseri açısından prekanseröz olduğu bilinen bir bakteridir. Bu nedenle *H. pylori*'nin eradikasyonu önerilmekte ve mide kanser gelişiminin önlenmesinde önem kazanmaktadır. Ancak mevcut koşullarda uygulanan tedavi rejimleriyle, gerek antibiyotik direnci gerekse *H. pylori*'ye ait antijenik yapılar nedeniyle yeterli eradikasyon oranlarına ulaşmak mümkün olamamıştır. Tekrarlayan *H. pylori* enfeksiyonları hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemekte, mide ülseri, bulbus ülseri, mide kanseri gibi sebep olduğu patolojiler nedeniyle morbidite ve mortaliteye sebep olabilmektedir. Güncel bilgiler ışığında bakterilerin maya vakuollerini rezervuar gibi kullanarak ve maya hücrelerinin içinde gizlenerek endofungal birliktelikler kurarak antibiyotiklere ve stresli koşullara karşı direnç gösterip hayatta kalmayı başarabildikleri gösterilmiştir. Maya içerisinde yaşayan endofungal bakterilere dair sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada hastalardan alınan mide biyopsi örneklerinden izole edilen *Candida* türleri içerisinde *H. pylori*'nin varlığı araştırılmıştır. Böylece çalışma sayesinde maya içerisindeki endofungal birlikteliklerle ilgili verilere katkı sağlanabilecek ve *H. pylori* kaynaklı hastalıkların tekrarlamasını önlemek amacıyla bakteriyle savaşmanın yanında içerisinde bakteri barındıran maya ile savaşmanın da hastalığın tekrarlaması açısından önemli olduğuna dikkat çekilecektir. Bu konu ile ilgili ülkemizde şuana kadar yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın önümüzdeki süreçte bu alanda gerçekleşecek olan çalışmaların önünü açacağını düşünmekteyiz. Çalışma Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (FDK-2021-23381).

İZMİR, 2024

Derya BİROL

ÖZET

MİDEDE CANDIDA SPP. İÇİNDE *HELICOBACTER PYLORI* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

BİROL, Derya

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR

2. Danışman: Doç. Dr. Nalan Gülşen ÜNAL

Ağustos 2024 , 265 Sayfa

Son yıllarda yapılan çalışmalar *Helicobacter pylori*'nin *Candida* mayasının vakuolü içinde gizlenerek kendini koruduğunu göstermektedir. Bu stratejinin bakterinin kendisini, çevresel pH'daki değişikliklere karşı veya onu yok etmek için kullanılan antibiyotik tedavilerine karşı geliştirdiği “hayatta kalma stratejisi” olduğu düşünülmektedir. Hücre içi endofungal bakteriler mayaların vakuollerinin içinde yaşayarak hücre yapılarını koruyup hayatta kalmaya devam ederek kendilerini gelecek nesillere aktarabilmektedirler. *Candida* spp. stresli koşullara son derece dirençli olan ve içerisinde barındırdığı bakterileri bu koşullara karşı koruyacak alternatif bir konukçu olarak hizmet etmektedir.

Bu tez çalışmasında, çeşitli şikayetleri nedeniyle Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji kliniğine başvuran ve takip eden hekimi tarafından tıbbi açıdan özofagogastroduodenoskopi (ÖGD-Üst GİS Endoskopisi) işlem endikasyonu konulan 233 hastanın mide biyopsi örnekleri kullanılmıştır. Midenin antrum ve korpus bölgelerinden alınan biyopsi örneklerinden *Candida* türlerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. *Candida* türlerinin vakuolü içinde endofungal *H. pylori* saptanması için bakteriyel türlerin kültürden bağımsız moleküler analizlerinde, en sık kullanılan yöntemlerden biri olan Floresan in situ hibridizasyonu yöntemi(FISH) kullanılmıştır. İçerisinde endofungal *H. pylori* tespit edilen *Candida* türlerinin total DNA'sı kullanılarak *H. pylori* 16S rDNA gen

bölgesinin, *H. pylori*'nin virulans genleri olan ureAB, vacA geni s1/s2 alleli ve vacA geni m1/m2 allelinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* türlerinin amfoterisin B ve flukonazole karşı in vitro antifungal duyarlılık testleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışma sonucunda analize alınan 233 hastanın 94'ünün (%40,3) mide biyopsi örneklerinden toplamda 159 adet *Candida* türü izole edilmiştir. Midenin antrum bölgesinden izole edilen *Candida* spp. izolatu sayısı 92 ve korpus bölgesinden izole edilen *Candida* spp. izolatu sayısı 67'dir. 159 *Candida* izolatının EUB338 prob ile gerçekleştirilen FISH analizi sonucunda 99 tanesinde hücre-içi endofungal bakteri tespit edilmiştir. *H. pylori* spesifik probe ile gerçekleştirilen FISH analizi sonucunda 48 *Candida* spp. izolatında endofungal *H. pylori* tespit edilmiştir. Hücre-içi endofungal bakteri tespit edilen 51 *Candida* izolatında *H. pylori* tespit edilmemiştir. FISH analizi sonucunda içerisinde endofungal *H. pylori* varlığı tespit edilen 48 *Candida* spp. izolatının hepsinde *H. pylori*'ye özgü 16S rRNA geni tespit edilmiştir. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran 8 *Candida* spp. izolatında *H.pylori*'nin virulans genlerinden vacA geninin s1/s2 alleli tespit edilmiştir. Hiçbir izolatta vacA geninin m1/m2 alleli tespit edilmemiştir. İçerisinde endofungal *H. pylori* tespit edilen 7 *Candida* spp. izolatında *H. pylori*'nin virulans genlerinden ureAB geni tespit edilmiştir. Çalışmada içerisinde *H. pylori* varlığı tespit edilen 2A, 4K, 23A, 24K, 33A, 37A, 41A, 74K, 114K2, 115A, 116K, 126K, 127A, 136K, 165A, 199A, 204K, 239A, 250K, 257A, 263A, 368K2, 369A3, 370K2, 406K kodlu izolatların *Candida albicans* olduğu *C. albicans* species-specific PCR ile doğrulanmıştır. Geri kalan izolatların sekans analizi sonucunda çalışmada içerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida*'lardan 2A, 4K, 23A, 24K, 33A, 34K, 37A, 38K, 41A, 74K, 114K1, 114K2, 115A, 116K, 126K, 127A, 129A, 136K, 165A, 166K, 199A, 204K, 214K, 239A, 246K, 250K, 257A, 263A, 305A, 368K2, 369A3, 370K2, 400K, 406K kodlu izolat *Candida albicans*; 119A kodlu izolat *Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata*); 260K, 285A, 299A1, 299A2, 300K2, 323A, 332A2, 351A3, 361A, 365A, 369A1, 392K, 405A2 kodlu izolat *Candida tropicalis* türleri olarak saptanmıştır. Çalışmada 48 *Candida* spp. izolatın amfoterisin B ve flukonazole karşı antifungal duyarlılık testi

gerçekleştirilmiştir. Amfoterisin B'nin tüm izolatlar için 24. Saatteki MİK₅₀ değeri 64 µg/ml olarak bulunmuştur. Flukonazol'un *C. albicans* izolatları için 24. Saatteki MİK₅₀ değeri 24 µg/ml, *C. tropicalis* izolatları için 24. Saatteki MİK₅₀ değeri 16 µg/ml olarak bulunmuştur. *C. glabrata* izolatının amfoterisin B ve flukonazol MİK değeri 64 µg/ml olarak bulunmuştur.

Hastaların mide biyopsi örneklerinden izole edilen *Candida* türleri içerisinde *H. pylori* varlığına dair veriler ile aynı hastaların mide biyopsi örneklerinin *H. pylori* varlığı açısından histopatolojik incelemesi sonucundaki veriler istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). Bireylerin midelerinin antrum bölgesinden alınan biyopsi örneklerinin *H. pylori* varlığı açısından histopatolojik incelemeleri sonucu ve daha önce *H. pylori* eradikasyon tedavisi alıp almadığı durumu istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Bireylerin sigara kullanımı ve korpustan alınan mide biyopsi örneklerinin *H. pylori* varlığı açısından histopatolojik incelemesi sonucu istatistiksel olarak anlamlıdır. ($p<0.05$).

Yaptığımız çalışmanın sonuçları *H. pylori* kaynaklı hastalıkların tekrarlamasını önlemek amacıyla bakteriyle savaşmanın yanında içerisinde bakteri barındıran maya ile savaşmanın da hastalığın tekrarlama açısından önemli olduğuna dikkat çekmektedir. Bakterinin mide ortamında bilinmeyen koşullar altında mayadan dışarıya salınması bireylerin tekrar *H. pylori* ile enfekte olmasına neden olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Tekrarlayan *H. pylori* enfeksiyonları hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemekte, mide ülseri, bulbus ülseri, mide kanseri gibi sebep olduğu patolojiler nedeniyle morbidite ve mortaliteye sebep olabilmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızın sonuçları klinik açıdan önem taşımaktadır. Ayrıca çalışmamız maya içerisinde yaşayan endofungal bakterilerin çeşitliliği hakkında yapılacak olan çalışmalar konusunda ışık tutacağı kanısındayız. *H. pylori*'nin maya hücresi içine girişi ve çıkışı hakkındaki mekanizmalar hala netliğe kavuşmamıştır ve bu konuda daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamız Türkiye'de *Candida* içerisinde endofungal *H. pylori*'nin varlığının araştırılmasına dair ilk çalışmadır.

Anahtar sözcükler: Bakteri-maya birliktelikleri; endofungal birliktelik;
mide; *Candida* spp.; maya vakuolü; *H. pylori*



ABSTRACT

INVESTIGATION FOR THE PRESENCE OF *HELICOBACTER PYLORI* WITHIN *CANDIDA* SPP. IN THE STOMACH

BİROL, Derya

PhD in Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. Ozlem ABACI GUNYAR

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nalan Gülşen ÜNAL

Aug 2024, 265 pages

Studies conducted in recent years show that *Helicobacter pylori* protects itself by hiding in the vacuole of the *Candida* yeast. This strategy is thought to be a “survival strategy” in which the bacterium develops itself against changes in environmental pH or antibiotic treatments used to destroy it. Intracellular endofungal bacteria live inside the vacuoles of yeasts, protect their cell structure, continue to survive and transmit themselves to future generations. *Candida* spp. serves as an alternative host that is extremely resistant to stressful conditions and will protect the bacteria it contains against these conditions.

In this thesis study, stomach biopsy samples of 233 patients who applied to the Gastroenterology clinic of Ege University Faculty of Medicine due to various complaints and who were medically indicated for esophagogastroduodenoscopy (EGD-Upper GIS Endoscopy) procedure were used. *Candida* species were isolated from biopsy samples taken from the antrum and corpus regions of the stomach. Fluorescence in situ hybridization method (FISH), one of the most commonly used methods in culture-independent molecular analysis of bacterial species, was used to detect endofungal *H. pylori* in the vacuole of *Candida* species. Using the total DNA of *Candida* species in which endofungal *H. pylori* was detected, amplification of the *H. pylori* 16S rDNA gene region and the virulence genes of *H. pylori*, namely ureAB, vacA gene s1/s2 allele and vacA gene m1/m2 allele, was performed. In vitro

antifungal susceptibility tests of *Candida* species harboring endofungal *H. pylori* against amphotericin B and fluconazole were performed.

As a result of the study, a total of 159 *Candida* species were isolated from the stomach biopsy samples of 94 (40,3 %) of the 233 patients analyzed. The number of *Candida* spp isolates isolated from the antrum region of the stomach is 92 and the number of *Candida* spp isolates isolated from the corpus region is 67. As a result of FISH analysis performed with the EUB338 probe of 159 *Candida* isolates, intracellular endofungal bacteria were detected in 99 of them. As a result of FISH analysis performed with an *H. pylori* specific probe, endofungal *H. pylori* was detected in 48 *Candida* spp isolates. *H. pylori* was not detected in 51 *Candida* isolates in which intracellular endofungal bacteria were detected. As a result of FISH analysis, the 16S rDNA gene specific to *H. pylori* was detected in all 48 *Candida* spp. isolates in which the presence of endofungal *H. pylori* was detected. The s1/s2 allele of the vacA gene, one of the virulence genes of *H. pylori*, was detected in 8 *Candida* spp. isolates harboring endofungal *H. pylori*. The m1/m2 allele of the vacA gene was not detected in any isolate. The ureAB gene, one of the virulence genes of *H. pylori*, was detected in 7 *Candida* spp isolates in which endofungal *H. pylori* was detected. In the study, the isolates coded 2A, 4K, 23A, 24K, 33A, 37A, 41A, 74K, 114K2, 115A, 116K, 126K, 127A, 136K, 165A, 199A, 204K, 239A, 250K, 257A, 263A, 368K2, 369A3, 370K2, 406K, in which the presence of *H. pylori* was detected, were confirmed to be *Candida albicans* by *C. albicans* species-specific PCR. As a result of the sequence analysis of the remaining isolates, the isolate coded 2A, 2A, 4K, 23A, 24K, 33A, 34K, 37A, 38K, 41A, 74K, 114K1, 114K2, 115A, 116K, 126K, 127A, 129A, 136K, 165A, 166K, 199A, 204K, 214K, 239A, 246K, 250K, 257A, 263A, 305A, 368K2, 369A3, 370K2, 400K, 406K among the *Candida* species containing endofungal *H. pylori* were detected as *Candida albicans* species; isolate coded 119A was detected *Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata*); isolate coded 260K was detected as *Candida tropicalis* species. In the study, antifungal susceptibility testing of 48 *Candida* spp. isolates against amphotericin B and fluconazole was performed. The MIC₅₀ value of amphotericin B at 24 hours for all isolates was found to be 64 µg/ml. The MIC₅₀

value of fluconazole at the 24th hour for *C. albicans* isolates was 24 µg/ml, and the MIC₅₀ value at the 24th hour for *C. tropicalis* isolates was 16 µg/ml. The amphotericin B and fluconazole MIC values of the *C. glabrata* isolate were found to be 64 µg/ml.

Data on the presence of *H. pylori* among *Candida* species isolated from stomach biopsy samples of patients and the data on the histopathological examination of stomach biopsy samples of the same patients for the presence of *H. pylori* are not statistically significant ($p>0.05$). The results of histopathological examination of biopsy samples taken from the antrum region of the stomach of individuals for the presence of *H. pylori* and whether or not they had previously received *H. pylori* eradication treatment are statistically significant ($p<0.05$). The results of histopathological examination of the individuals' smoking habit and the gastric biopsy samples taken from the corpus for the presence of *H. pylori* are statistically significant ($p<0.05$).

The results of our study point out that in addition to fighting bacteria in order to prevent the recurrence of *H. pylori*-related diseases, fighting the yeast that contains bacteria is also important in terms of recurrence of the disease. It should be taken into consideration that the release of the bacterium from the yeast under unknown conditions in the stomach environment may cause individuals to become re-infected with *H. pylori*. Recurrent *H. pylori* infections negatively affect the patient's quality of life and may cause morbidity and mortality due to pathologies such as stomach ulcer, bulbus ulcer, and stomach cancer. In light of all this information, the results of our study are clinically important. We also believe that our study will shed light on future studies on the diversity of endofungal bacteria living in yeast. The mechanisms of *H. pylori* entry and exit into the yeast cell are still unclear and further research is needed on this subject. Our study is the first study to investigate the presence of endofungal *H. pylori* in *Candida* in Turkey.

Key words: Bacteria-yeast associations; endofungal association; stomach; *Candida* spp.; yeast vacuole; *H. pylori*



İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL ONAY SAYFASI.....	v
EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	ETİK
KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	vii
ÖNSÖZ.....	ix
ÖZET.....	xvii
ABSTRACT.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxiii
ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)	xxiv
ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)	xxv
ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)	xxvi
ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)	xxvii
TABLolar DİZİNİ	xxix
TABLolar DİZİNİ (devam).....	xxx
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxxi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	10

2.1.	İnsan Mikrobiyotasına Giriş	10
2.2.	İnsan Mikrobiyota Üyeleri	12
2.3.	Bakteriyel Fungal Etkileşimler	18
2.4.	İnsan Sağlığı Açısından Önemli <i>Candida</i> -Bakteri Etkileşimleri	22
2.4.1	Ağız boşluğundaki <i>Candida</i> -bakteri etkileşimleri:	24
2.3.2.	Vajinal bölgedeki <i>Candida</i> -bakteri etkileşimleri:	28
2.3.3.	Bağırsak ve gastrointestinal sistemdeki <i>Candida</i> -bakteri etkileşimleri:	29
2.3.4.	Nazofaringeal bölgedeki <i>Candida</i> -bakteri etkileşimleri:	31
2.4.	Endofungal Birliktelikler	34
2.5.	İnsan Vücudundaki Endofungal Bakteriler	40
2.6.	<i>Candida</i> spp. Ve Endofungal Bakteriler	44
2.6.1.	<i>Helicobacter pylori</i> :	44
2.6.2.	<i>H. pylori</i> 'nin virulans özellikleri:	45
2.6.3.	<i>Candida-H. pylori</i> endofungal birlikteliği:	48
2.6.4.	<i>H. pylori</i> 'nin <i>Candida</i> içerisine giriş mekanizması:	58
2.6.5.	<i>H. pylori</i> 'nin <i>Candida</i> içerisinden çıkış mekanizması:	64
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	73

3.1 Gereçler	73
3.1.1 Çalışma materyalleri:	73
3.1.2 Kullanılan başlıca cihazlar:	87
3.1.3 Referans suşlar:	88
3.1.4 Antifungal duyarlılık testinde kullanılan malzemeler:	88
3.2 Yöntem	89
3.2.1 Örneklerin alımı ve laboratuvara getirilmesi:	89
3.2.2 <i>Candida</i> spp. izolasyonu:	89
3.2.3 <i>Candida</i> türleri içerisinde endofungal <i>H. pylori</i> varlığının araştırılması: 90	
3.2.4 PCR tabanlı moleküler yöntemler ile <i>Candida</i> türleri içerisinde endofungal <i>H. pylori</i> varlığının araştırılması:	97
3.2.5 İçerisinde endofungal <i>H. pylori</i> barındıran <i>Candida</i> türlerine ait total dna'ların <i>C. albicans</i> spesifik primerler ile amplifikasyonu:	104
3.2.6 İçerisinde endofungal olarak <i>H. pylori</i> barındıran <i>Candida</i> spp. izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması:	105
3.2.7 <i>Candida</i> türlerinden endofungal <i>H. pylori</i> suşlarını kültüre etme çalışmaları:	107
3.2.8 <i>Candida</i> türlerinin in vitro antifungal duyarlılık testleri:	109
3.2.9 İstatistiksel analizler:	110

4.BULGULAR	111
4.1 Çalışma Grubunu Oluşturan Bireyler	111
4.2 <i>Candida</i> spp. İzolasyonu	111
4.3 FISH Yöntemi İle <i>Candida</i> Türleri İçerisinde Endofungal <i>H. pylori</i> Varlığının Araştırılması	112
4.4 PCR tabanlı moleküler yöntemler ile <i>Candida</i> türleri içerisinde endofungal <i>H. pylori</i> varlığının araştırılması	129
4.4.1 <i>Candida</i> türlerinden izole edilen total DNA'ların <i>H. pylori</i> 16S rDNA gen bölgesi için spesifik primerler ile amplifikasyonu:	129
4.5 <i>Candida</i> Türlerinden İzole Edilen Total DNA'ların <i>H. pylori</i> Virülans Faktörlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin Spesifik Primerler İle Amplifikasyonu	131
4.5.1 <i>vacA</i> geninin amplifikasyonu:	131
4.5.2 <i>ureAB</i> gen bölgesinin amplifikasyonu:	132
4.6 İçerisinde Endofungal <i>H. pylori</i> Barındıran <i>Candida</i> Türlerine Ait Total DNA'ların <i>C. albicans</i> Spesifik Primerler ile Amplifikasyonu	134
4.7 <i>Candida</i> Türlerinden Endofungal <i>H. pylori</i> Suşlarını Kültüre Etme Çalışmaları	138
4.8 İçerisinde Endofungal <i>H. pylori</i> Barındıran <i>Candida</i> İzolatlarının Antifungal Duyarlılık Testleri:	138
4.9 İstatistiksel Analiz Sonuçları	139

5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	141
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	177
KAYNAKLAR.....	178
TEŞEKKÜR.....	223
ÖZGEÇMİŞ	225
EK1.....	226
EK2.....	230



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil

Sayfa

Şekil 2.1. Disbiyozisden hasara geçiş17

Şekil 2.2. Bakteriyel-fungal etkileşimler için klinik açıdan önemli anatomik bölgeler.....19

Şekil 2.3. Bakteriler ve funguslar arasındaki fiziksel ilişkiler ve moleküler etkileşimler.....21

Şekil 2.4 Endofungal bakterilerin *Candida* türlerinin içerisine girişini etkileyen faktörler.....64

Şekil 3.1. Özofagogastroduodenoskopi (ÖGD) işlemi esnasında endoskopik yolla mide biyopsi örneklerinin alınması.....74

Şekil 3.2. Steril mikro plakalara aşıl原因 antifungaller ve *Candida* izolatları111

Şekil 4.1. 115A kodlu izolatın *Candida* Chromogenic Agar ortamındaki görüntüsü.....113

Şekil 4.2. Bakteri spesifik cy3-etiketli EUB338 floresan probu ile hibridizasyonu yapılan 2A kodlu *Candida* izolatının FISH görüntüleri...114

Şekil 4.3. *H. pylori*'ye spesifik cy3-etiketli Hpy floresan probu ile hibridizasyonu yapılan 23A kodlu *Candida* izolatının FISH görüntüleri115

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

Şekil 4.4. *H. pylori*'ye spesifik cy3-etiketli Hpy floresan probu ile hibridizasyonu yapılan 115A kodlu *Candida* izolatının FISH görüntüleri.....115

Şekil 4.5. *H. pylori*'ye spesifik cy3-etiketli Hpy floresan probu ile hibridizasyonu yapılan 126K kodlu *Candida* izolatının FISH görüntüleri116

Şekil 4.6. *H. pylori*'ye spesifik cy3-etiketli Hpy floresan probu ile hibridizasyonu yapılan 246K kodlu *Candida* izolatının FISH görüntüleri116

Şekil 4.7. A. *H. pylori*'ye spesifik cy3-etiketli Hpy floresan probu ile hibridizasyonu yapılan 290K kodlu kodlu *Candida* izolatının FISH görüntüleri B. Bakteri spesifik cy3-etiketli EUB338 prob ile hibridizasyonu yapılan 290K kodlu kodlu *Candida* izolatının FISH görüntüleri.....117

Şekil 4.8. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarının total DNA' sı ve *H. pylori* 16 s rDNA gen bölgesi için spesifik primerlerin kullanıldığı Nested- PCR'ın ardından ürünlerin agroz jelde görüntülenmesi (M: Moleküler ağırlık standardı).....130

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

Şekil 4.9. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarının total DNA' sı ve *H. pylori* 16S rDNA gen bölgesi için spesifik primerlerin kullanıldığı Nested- PCR'ın ardından ürünlerin agroz jelde görüntülenmesi (M: Moleküler ağırlık standardı).....131

Şekil 4.10. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarının total DNA' sı ve *H. pylori* 16S rDNA gen bölgesi için spesifik primerlerin kullanıldığı Nested- PCR'ın ardından ürünlerin agroz jelde görüntülenmesi (M: Moleküler ağırlık standardı).....131

Şekil 4.11. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarının total DNA' sı ve *H. pylori* 16 s rDNA gen bölgesi için spesifik primerlerin kullanıldığı Nested- PCR'ın ardından ürünlerin agroz jelde görüntülenmesi (M: Moleküler ağırlık standardı).....131

Şekil 4.12. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarında *H. pylori*'nin virulans genlerinden *vacA* geninin s1/s2 allelinin Nested PCR ile amplifikasyonunun ardından ürünlerin agroz jel görüntüsü (M:Moleküler ağırlık standardı)132

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

Şekil 4.13. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarında *H. pylori*'nin virulans genlerinden *vacA* geninin s1/s2 allelinin Nested PCR ile amplifikasyonunun ardından ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M:Moleküler ağırlık standardı)130

Şekil 4.14. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarında *H. pylori*'nin virulans genlerinden *vacA* geninin s1/s2 allelinin Nested PCR ile amplifikasyonunun ardından ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M:Moleküler ağırlık standardı).....133

Şekil 4.15. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarında *H. pylori*'nin virulans genlerinden *üreAB* geninin Nested PCR ile amplifikasyonunun ardından ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M:Moleküler ağırlık standardı)134

Şekil 4.16. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarında *H. pylori*'nin virulans genlerinden *üreAB* geninin semi- Nested PCR ile amplifikasyonunun ardından ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M:Moleküler ağırlık standardı)134

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**Şekil****Sayfa**

Şekil 4.17. *C. albicans* species- specific PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (Pozitif örnek: 10231, M:Moleküler ağırlık standardı).....135

Şekil 4.18. *C. albicans* species- specific PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....135

Şekil 4.19. *C. albicans* species- specific PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü136



TABLOLAR DİZİNİ

Tablo

Sayfa

Tablo 2.1 *Candida* spp. içinde yaşayan endofungal bakteriler57

Tablo 3.1 *H. pylori*'ye özgü 16S rDNA gen bölgesinin amplifikasyonu sırasında PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları.....102

Tablo 3.2 *vacA* geninin s1/s2 allelinin amplifikasyonu sırasında Nested PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları103

Tablo 3.3 *üreAB* gen bölgesinin amplifikasyonu için PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları105

Tablo 3.4 SS-PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları.....106

Tablo 3.5 26S rDNA PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları.....107

Tablo 3.6 ITS PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları.....107

Tablo 4.1 *Candida* izolatlarında endofungal bakteri varlığı, endofungal *H.pylori* varlığı, *H. pylori* tedavisi alıp almadığı, ÖGD yapılma nedeni.....119

TABLOLAR DİZİNİ (devam)

Tablo

Sayfa

Tablo 4.2 *Candida* sp. izolat kodu, mide biyopsi örneklerinin *H. pylori* varlığı açısından histopatolojik inceleme sonucu, ÖGD yapılma nedeni, endoskopi raporu, diş protezi varlığı, beslenme alışkanlığı, ek hastalıklar, son bir haftadır antibiyotik kullanımı126

Tablo 4.3. İzole edilen *Candida* izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması, accession numaraları, vac A geni s1/s2 alleli varlığı , vacA geni m1/m2 alleli varlığı, üre AB gen varlığı137

Tablo 4.4. *Candida* izolatlarının antifungal duyarlılık testi sonuçları.....139

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BHA	Brain Heart Agar
KA	Kan Agar
MYGP-A	Malt Yeast Glukoz Peptone Agar
PBS	Phosphate Saline Buffer
TBE	Tris Borik Asit EDTA
ÖGD	Özofagostroduodenoskopi
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
ITS	İnternal Transcribed Spacer
BLO	Bakteri Benzeri Organizmalar
BFI	Bakteriyel-Fungal Etkileşimler
PPI	Proton Pompası İnhibitörü
vacA	vakuolize sitotoksin A
GİS	Gastrointestinal Sistem



1.GİRİŞ

Helicobacter pylori (*H. pylori*) gram negatif, spiral, kamçılı, mikroaerofilik bir bakteridir. *H. pylori* insan midesini kolonize ederek gastrit, peptik ülser gibi patolojilere ve gastrik adenokarsinom ve mide mukozasıyla ilişkili lenfoid dokunun B hücre lenfoması gibi malignitelere neden olan bir bakteridir (Abadi ve Ierardi 2019; Sanchez-Alonso vd., 2021). Bu nedenle, *H. pylori* Dünya Sağlık Örgütü tarafından sınıf I kanserojen olarak sınıflandırılan tek bakteridir (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; International Agency for Research on Cancer, 1994; Hooi vd., 2017).

H. pylori prevalansı son yirmi yılda dünyanın farklı bölgelerinde değişiklik göstermekte olup, Afrika ve Asya'da daha yüksektir. Güney Amerika'da enfeksiyon prevalansına Şili (%74,6), Ekvador (%72,2) ve Brezilya (%71,2) öncülük etmektedir (Fischbach ve Malfertheiner, 2018). *H. pylori* enfeksiyonu, dünya çapında özellikle gelişmekte olan ülkelerde, en yaygın insan enfeksiyonlarından biri olmaya devam etmektedir. *H. pylori*'nin erken aşamada, özellikle atrofi gelişmeden önce eradike edilmesi yaygın olarak tavsiye edilmektedir (Burucoa vd., 2017; Calvet 2018; Fallone ve Moss, 2019). Bununla birlikte, son zamanlarda, ardışık tedavi, eşzamanlı tedavi ve bismuth rejimler dahil olmak üzere çeşitli tedavi stratejileri denendikten sonra bile, eradikasyonda istenilen başarı elde edilememiştir (Goderska vd., 2018; Savoldi vd., 2018; O'Connor vd., 2019; Hu vd., 2020).

H. pylori ile mücadelede eradikasyon başarısızlığının nedenlerini belirlemek önemlidir. Daha önce başarısızlık nedenleri olarak antibiyotik direnci, yüksek bakteri yükü, tedaviye düşük uyum, yüksek mide asiditesi ve sitokrom P450 2C19 polimorfizmi (CYP2C19) gibi birçok faktör önerilmiştir. Ancak bazı başarısızlık durumları bu faktörlerle açıklanamamaktadır (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; International Agency for Research on Cancer, 1994; Tacconelli vd., 2018; Parra-Sepúlveda vd., 2019).

H.pylori ile enfekte olan bazı hastalar tedavi sırasında iyi uyum gösterebilir bile direnç nedeniyle antibiyotik ile eradike edilemedikleri gözlemlenmiştir ve başarısızlığı açıklamak için daha farklı sebepler aranmaktadır. *H. pylori*'nin kanser gelişimine sebep olabilme potansiyeli göz önüne alındığında bakterinin eradikasyonu konusunda yapılan çalışmalar önem taşımaktadır. Ayrıca bu konuda yapılan çalışmalar *H. pylori* enfeksiyonunun bulaşma mekanizmalarını aydınlatmak ve bu patojen tarafından meydana gelen enfeksiyonun ortadan kaldırılmasını sağlayacak antibiyotikler kullanarak gerçekleştirilen tedavilerin geliştirilmesi konusunda önem taşımaktadır (Abadi ve Ierardi 2019; Sanchez-Alonso vd., 2021; IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; International Agency for Research on Cancer, 1994; Saniee vd., 2013; Reshetnyak vd., 2017; Matamala-Valdés vd., 2018; Kadkhodaei vd., 2019; Krzyżek vd., 2020).

Son yirmi yılda, bu bakteriyi yok etmek için önerilen tedavi, klaritromisin (CLT), amoksisilin (AMX) ve metronidazol (MTZ) ile ilişkili bir proton pompası veya ranitidin-bismuth-sitrat inhibitörü de dahil olmak üzere standart üçlü tedavi olmuştur. Bununla birlikte, *H. pylori*'nin başta CLT olmak üzere kullanılan antibiyotiklere karşı artan direnci bu tedavi şemasının başarısını azaltmıştır. Bu nedenle, sıralı veya dördümlü olanlar gibi ikinci basamak tedaviler kullanılmıştır. Ayrıca ilk ikisi başarısız olduğunda üçüncü veya dördüncü basamak tedaviler kullanılmıştır (Saniee vd., 2013; Siavoshi vd., 2013; Lai vd., 2006; Sánchez-Alonso vd., 2020). *H. pylori* tedavisindeki ana zorluk; CLT, MTZ ve levofloksasin gibi antibiyotiklerin bazı coğrafi bölgelerdeki bireyler tarafından bilinçsiz kullanılmasına bağlı olarak bakterinin antibiyotik tedavisine karşı direnç geliştirmesinden kaynaklanmaktadır (Moris vd., 2008 ; Angebault vd., 2013). Bu nedenle, CLT'ye dirençli *H. pylori* suşları, DSÖ tarafından tedavilerine yardımcı olacak yeni ilaçlar aramak ve geliştirmek için yüksek öncelikli suşlar olarak tanımlanmıştır (Baltrus vd., 2006). Tedaviler, esas olarak CLT'ye dirençli suşların ortaya çıkması nedeniyle etkinliklerini kaybetmiş olsa da, başarısızlıklarına katkıda bulunan başka faktörler de vardır. Bu bağlamda, bu bakteriyi yok etmek için kullanılan AMX, CLT veya MTZ gibi bazı ilaçların, bakterinin kokoid morfolojisi

gibi morfolojik ve fizyolojik adaptasyonlarını tetikleyerek *H. pylori* için stres faktörleri olarak hareket edebileceği gösterilmiştir (Bury-Moné vd., 2006; Parreira vd., 2011). Bakterideki morfolojik değişikliğin (kokoid morfoloji) direnç, enfeksiyonun yayılması ve antibiyotik tedavisinden sonra enfeksiyonun tekrarlaması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Estibariz vd., 2019).

Tedavinin verimsizliğinin nedenlerinden birinin *H. pylori*'nin hücre içi fakültatif doğası olduğu düşünülmektedir. Bu araştırmalar, 1984 yılında, gastrit ve ülserli hastalarda “*Campylobacter* tipi organizmaların” hücreler arası boşlukları istila ettiği rapor edildiğinde başlamıştır (Campos vd., 2018). Son yıllarda yapılan bazı in vivo ve in vitro çalışmalarda, *H. pylori*'nin gastrik epitel hücreleri, makrofajlar ve dentrik hücreler gibi bağışıklık hücrelerinde, amipler ve *Candida* mayaları gibi çeşitli ökaryotik hücrelerde barınabileceği gösterilmiştir (Siavoshi vd., 2003; Salmanian vd., 2007; Saniee vd., 2013a; Saniee vd., 2013b; Siavoshi vd., 2013; Matamala-Valdés vd., 2018; Sánchez-Alonzo vd., 2020).

H. pylori internalizasyonu , bakterilerin hücreleri istila ettiği bir aktivitedir. Bu aktivite nedeniyle, bakteri vücutta yok edilmekten kaçabilir ve hayatta kalıp çoğalabilmektedir. Bu nedenle konukçu, bakteriyi içerisinde barındırarak uzun süre taşıyabilmektedir (Maidan vd., 2008; Thewes vd., 2008). Bu bulgular; internalizasyonun bakterinin kendisini, çevresel pH'daki değişikliklere karşı veya onu yok etmek için kullanılan antibiyotik tedavilerine karşı geliştirdiği “hayatta kalma stratejisi” olduğunu düşündürmektedir (Momyaliev vd., 2013; Donofrio vd., 2015; Weerasekera vd., 2016).

Funguslar ve bakteriler, tarım ve insan sağlığı açısından önemli olan karmaşık topluluklar oluşturarak bir arada yaşayabilmektedirler. Bu birlikteliklerden birisi olan endofungal yaşam son zamanlarda ilgi çekmektedir. Fungusların içerisinde yaşayan bakteriler, bakteri ve funguslar arasındaki en karmaşık ilişkilerin kurulmasına neden olan endofungal veya endohifal bakteriler (EFB'ler veya EHB'ler) olarak adlandırılmaktadır (Deveau vd., 2018; Pawlowska vd., 2018). Endofungal bakterilerin varlığı ilk olarak Mosse (1970) tarafından

Endogone sporlarının sitoplazmasında elektron mikroskobu aracılığıyla gözlenmiş ve rapor edilmiştir. Sonraki yıllarda araştırmacılar, arbusküler mikorizal fungusların (AMF) çeşitli türlerinde endofungal bakterileri keşfetmişlerdir (MacDonald ve Chandler, 1981; Sward, 1981; Scannerini ve Bonfante-Fasolo, 1991; Schüßler vd., 1994). Bu alanda elektron mikroskobu ile yapılan araştırmalarda arbusküler mikorizal fungusların sitoplazmalarında "bakteri benzeri cisimcikler (BLO)" saptanmıştır. Saptanan bakteri benzeri cisimcikler kültürlenemediği için, kimlikleri belirsiz kalmıştır. Kültürden bağımsız moleküler tekniklerin (örn., FISH) ortaya çıkmasıyla, "kültüre edilemeyen" endofungal bakterileri tespit etmek ve karakterize etmek mümkün hale gelmiştir. Endofungal bakteriler fungus miselyumu içerisinde yaşamaktadır (Partida-Martinez vd., 2005; Partida-Martinez vd., 2007; Partida-Martinez vd., 2008; Lackner vd., 2009; Lackner vd., 2011; Birol ve Günyar, 2021; Günyar vd., 2022). Endofungal bakteriler daha sonra bakteriye özgü boyalar, bakteriye özgü problemlerle floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve pirosekanslama kullanılarak tanımlanmıştır (Sun vd., 2019). Fungus hücrelerinin içinde endofungal olarak yaşayan bakteriler uzun süredir bilinmektedir ve özellikle çevresel örneklerden izole edilen funguslar içerisinde yaşayan endofungal bakterilerin çeşitliliğine ve endofungal bakterilerin ürettiği sekonder metabolitler üzerine yapılmış çok sayıda çalışma vardır (Partida-Martinez vd., 2005; Partida-Martinez vd., 2007; Partida-Martinez vd., 2008; Lackner vd., 2009; Lackner vd., 2011; Birol ve Günyar, 2021; Günyar vd., 2022; Liu vd., 2024). Ancak klinik örneklerden izole edilen funguslar ve barındırdıkları endofungal bakteriler ile ilgili çok sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu tarz birliktelikleri oluşturan mikroorganizmaların belirlenmesi, Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından başlatılan İnsan Mikrobiyom Projesi gibi çok sayıda çalışmanın odak noktası olmuştur (Bianciotto vd., 1996; Partida-Martinez vd., 2005; Turnbaugh vd., 2007; Estrada-de Los Santos vd., 2018; Steffan vd., 2020; Birol ve Günyar, 2021; Günyar vd., 2022; Siavoshi vd., 2003; Partida-Martinez vd., 2005; Partida-Martinez vd., 2007; Salmanian vd., 2008; Partida-Martinez vd., 2008; Lackner vd., 2009; Lackner vd., 2011; Saniee vd., 2013a; Saniee vd., 2013b; Siavoshi vd., 2013; Matamala-Valdés vd., 2018; Siavoshi vd., 2019; Sánchez-Alonzo vd., 2020; Heydari vd., 2020).

Mayalar, antimikrobiyaller, konukçu bağımsızlık sistemi dahil çevresel streslere karşı iyi adapte olabilme kabiliyetine sahip oldukça sofistike mikroorganizmalardır. *Candida* türleri, insanların normal mikrobiyotası olarak deri, ağız, vajina ve gastrointestinal sistemde bulunurlar ve fırsatçı organizmalar olarak kabul edilirler. *Candida albicans*, bağımsızlık sistemi baskılanmış hastalarda kandidiyazise neden olabilen bir insan kommensalidir. En yaygın morfolojileri maya ve hif olan pleomorfik bir fungustur. Bakteriyel-fungal etkileşimler genellikle *Candida* spp. ve çeşitli bakteri türleri arasında oluşmaktadır. *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Pseudomonas*, maya hücresine değil; tercihen hiflere yapışan, *C. albicans* ile ilişkili üç cinstir. Bakterinin hiflere yapışması, fungal ve bakteriyel yüzey moleküllerine ve salgılanan faktörlere bağlıdır (Silverman vd., 2010; Ovchinnikova vd., 2012; Ovchinnikova vd., 2013; Beaussart vd., 2013).

1978 yılında yapılan bir çalışmada mide ülseri olan hastaların midesinde *Candida* varlığı bildirilmiştir. Daha sonra mide kanseri, peptik ülser, kronik gastrit ve mide patolojisi olmayan kişilerde de varlığı bildirilmiştir. Maya kolonizasyonunun mide hastalıklarının gelişimindeki etkisi henüz netlik kazanmamıştır, ancak *Candida*'nın varlığı, mide ülserinin kalıcılığında aktif bir rol ile ilişkilendirilmiştir. *Candida* mayaları normal iyileşme sürecini engellemektedir ve hastalarda kalıcı klinik semptomlar oluşturmaktadır (Duan vd., 2022).

Candida spp. çoğunlukla bireylerin gastrointestinal sistemi (GIS), genitoüriner sistemi ve cildin mukozal yüzeylerinde gelişmektedir. *H. pylori* bakterisi de gastrointestinal sisteminde bulunmaktadır. Bu durum her iki organizmanın da bu bölgeye iyi adapte olabildiğini göstermektedir. Karczewska ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ülser olmayan dispepsi, mide ülseri ve duodenum ülseri gibi üst gastrointestinal sistem hastalıklarını analiz ederek *Candida* ve *H. pylori* varlığı ile mide ülseri gelişimi arasında bir ilişki kurarak, hastalığın patogenezinde bu mikroorganizmalar arasında sinerjik ilişkiye dikkat çekmiştir (Karczewska vd., 2009; Massarrat vd., 2016).

Bakteriler ve mayalar milyarlarca yıldır birlikte yaşamış olsa da, mikrobiyal etkileşimin biyolojik önemi büyük ölçüde bilinmemektedir. Mikrobiyal etkileşimlerin detaylarına ışık tutmak, bulaşıcı hastalıkların, özellikle antimikrobiyal tedaviye direnç gösteren türlerin kontrolünde önem taşımaktadır. Hücre içi bakteriler (endofungal bakteriler), ökaryotik hücreler olan mayaların membrana bağlı vakuollerinin içinde yaşayarak hücre yapılarını koruyup hayatta kalmaya devam ederler ve bu şekilde kendilerini gelecek nesillere aktarabilmektedirler. Bakteriler kendilerini maya hücrelerinin içinde gizleyerek stresli koşullara karşı direnç gösterip hayatta kalmaktadırlar. Örneğin; *Candida* spp. stresli koşullara son derece dirençli olduğundan, *H. pylori*'yi bu koşullara karşı koruyacak alternatif bir konukçu olarak hizmet edebilir, bakterinin çoğalması için besin sağlayabilir ve bakterilerin çevreye ve insandan insana yayılması için aracı olabilmektedir. (Siavoshi vd., 2003; Salmanian vd., 2007; Saniee vd., 2013a; Saniee vd., 2013b; Siavoshi vd., 2013; Matamala-Valdés vd., 2018; Sánchez-Alonzo vd., 2020). *H. pylori* enfeksiyonu mide hastalıklarında maya ile pozitif korelasyon göstermektedir (Karczewska vd., 2009). *H. pylori* açısından pozitif olan mide ülserli hastaların %36'sında, ülseratif olmayan dispepsi hastalarının %2'sinde ve büyük ölçekli mide ülseri (2 cm'den büyük) hastalarının %56'sının üst gastrointestinal sisteminde, ülseratif lezyonlarda *H. pylori*'nin *C. albicans* ve *Candida krusei* gibi mayalarla birlikte kolonize olması, bu organizmalar arasındaki güçlü bir ilişkinin olduğunu göstermektedir (Ramaswamy vd., 2007). Mide kanseri, peptik ülser ve kronik gastrit hastalarında *C. albicans*'ın *H. pylori* ile birlikte bulunduğu tespit edilmiştir. Midesinde *C. albicans* ve *H. pylori* bulunan mide ülserli hastaların ülserlerinin daha büyük olduğu gözlenmiştir. *C. albicans*'ın varlığı, iyileşme süresinin uzaması ve klinik semptomların devam etmesine yol açması nedeniyle mide hastalıklarının iyileşme süresinin uzamasına neden olmaktadır (Ince vd., 2014; Khetsuriani vd., 2012). Mide hastalıklarının gelişiminde *C. albicans* ve *H. pylori* arasındaki güçlü pozitif korelasyon, her iki organizmanın sinerjistik ilişkisi sonucunda meydana gelen patogenezi göstermektedir (Karczewska vd., 2009; Chen vd., 2021). *C. albicans*, adhezyon gibi yetenekleri sayesinde -tıpkı diğer bakterilerin patojenitesini arttırdığı gibi- *H.*

pylori'nin de kolonizasyonunu, toksisitesini ve patojenitesini, özellikle gastrointestinal hastalıklarda arttırabilmektedir (Abrantes ve Africa, 2019).

H. pylori istilacı bir hücre içi patojendir ve mide epitel hücreleri, dendritik hücreler ve makrofajlar gibi hücrelere girişi, antibiyotik tedavisinin başarısızlığının nedenlerinden biridir (Wang vd., 2017). *C. albicans* klinik izolatlarında, *Candida* hücrelerinin vakuollerinde hareket eden “bakteri benzeri cisimcikler” gözlenmiştir ve bunlar PCR ve immünfloresan yöntemler ile *H. pylori* olarak tanımlanmıştır (Saniee vd., 2013a; Saniee vd., 2013b; Siavosh vd., 2019). Bu "istila edilmiş" *C. albicans* hücreleri, yüksek sıcaklığa, kuruluğa ve antibiyotiklere direnç göstererek hayatta kalmayı başarmıştır. Maya vakuollerinin bu olumsuz koşullara karşı *H. pylori*'yi koruyabildiği görülmüştür (Saniee vd., 2013a) İstilacı *H. pylori*'nin *C. albicans*'ın yavru hücrelerine vertikal transmisyonu ve maya hücreleri içinde çoğalarak kendi proteinlerini ifade etmeye devam ettiği görülmektedir (Siavoshi vd., 2014). Bu birlikteliklerle ilgili çalışmaların çoğu ağız boşluğu ve vajina gibi vücudun bazı bölgelerinden izole edilen *Candida* türlerinde tespit edilmiştir (Siavoshi vd., 2013). Normal doğum ile dünyaya gelen bebeklerin ağız boşluğunda *H. pylori* barından *C. albicans*'ın sıklığı, sezeryan doğum ile dünyaya gelen bebeklere göre daha yüksektir; bu durum, vajinadaki *C. albicans*'ın *H. pylori*'nin yeni doğanların ağız boşluğuna transmisyonunda ana rezervuar olabileceğini göstermektedir (Siavoshi vd., 2005; Salmanian vd., 2008; Siavoshi vd., 2013; Sa'nchez-Alonzo vd., 2020). *C. albicans*'ın yanı sıra *Candida dubliniensis*, *Candida krusei* ve *Candida tropicalis* klinik izolatlarının total DNA'sı *H. pylori*'ye özgü 16S rDNA primerleri ile amplifiye edilmiştir. Bu durum *H. pylori* ile maya arasındaki bu tür etkileşimin farklı türlerde meydana gelebileceğini göstermektedir (Huong vd., 2013; Sa'nchez-Alonzo vd., 2020). *H. pylori*'nin istila ettiği *C. albicans* yalnızca insan vücudunda yaygın olarak dağılmakla kalmaz, aynı zamanda yoğurt, üzüm suyu, ekmek, reçeller, meyveler ve bal gibi yiyeceklerde de bol miktarda bulunmaktadır (Siavosh vd., 2018). *C. albicans*, *H. pylori*'yi bu habitatlardaki çevresel streslere karşı koruyabilmektedir. *C. albicans* hücrelerinin vakuollerinde; büyüme aşamasına, metabolik seviyeye ve stres tepkilerine bağlı olan, “dans eden cisimler” olarak bilinen bazı hareketli volutin (polifosfat) granülleri bulunmaktadır

(Puchkov, 2010; Kharchuk vd., 2019). *H. pylori*'nin varlığı, *C. albicans*'ın vakuollerinde volutin granüllerinin oluşumunu aktive eden bir stres tepkisine neden olabilmektedir. Bu nedenle, vakuoldeki "dans eden cisimleri" ayırt etmek ve *C. albicans* ile *H. pylori* arasındaki etkileşim mekanizmalarını değerlendirmek için daha fazla kanıtı ihtiyaç vardır. *C. albicans* hücre duvarının gözenekleri, *H. pylori*'nin geçebileceği kanal görevi görebilmektedir. Yapılan bir çalışmada FITC-IgY-işaretli *H. pylori*'nin, hücre duvarı gözenekleri aracılığıyla *C. albicans* hücrelerine girdiği ve sonunda vakuollerde biriktiği gözlenmiştir (Saniee vd., 2015). *H. pylori* ve *C. albicans* birlikte kültürlendiğinde, maya hücre duvarı/zarının yeniden şekillenmesi gibi spesifik mekanizmaların nasıl gerçekleştiği konusunda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Chen vd., 2021).

İki mikroorganizma arasındaki etkileşimin ne zamandan beri var olduğu henüz bilinmemektedir ve bu etkileşim bireylerin epitel hücreleri ve bağışıklık hücrelerinin işgali için bir ön adaptasyon şekli olarak maya vakuolü içinde hücre içi *H. pylori* bulunuşuna yol açmış olabileceği düşünülmektedir. Bu etkileşim tıpkı Truva atı gibi davranarak bakteriyi stres koşullarından koruyarak hayatta kalmasını sağlamaktadır. *H.pylori*'deki ergosterol bağımlılığı, maya vakuolü içindeki hayata adaptasyonun sonucu olarak gelişmiştir ve vakuol *H. pylori*'nin evrimi ve kalıcılığında önemli rol oynamaktadır (Siavoshi vd., 2005; Salmanian vd., 2008; Siavoshi vd., 2013; Sa'nchez-Alonzo vd., 2020).

Mayaların içerisinde yaşayan endofungal bakterilere dair yaptığımız literatür çalışmaları sonucunda bu konuda çok fazla çalışma yapılmadığı ve yapılan çalışmaların çoğunun oral boşluktan izole edilen *Candida* spp. ve *H.pylori* arasındaki ilişki üzerine yoğunlaştığını göstermektedir. Bizim çalışmamızda ilk olarak mide biyopsi örneklerinden *Candida* spp izolasyonu gerçekleştirilmiştir. *Candida* spp. vakuolü içinde hücre içi *H. pylori*'lerin saptanmasında, bakteriyel türlerin kültürden bağımsız moleküler analizlerinde, en sık kullanılan yöntemlerden biri olan Floresan in situ hibridizasyonu yöntemi(FISH) kullanılmıştır. Ayrıca içerisinde *H. pylori* tespit edilen *Candida* spp.'lerin total DNA'sı kullanılarak *H. pylori* 16S rDNA gen bölgesinin, *H. pylori*'ye özgü virulans genleri olan ureAB,

vacA geni s1/s2 alleli ve vacA geni m1/m2 allelinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. İçerisinde *H. pylori* barındıran *Candida* suşlarının amfoterisin B ve flukonazole karşı in vitro duyarlılık testleri gerçekleştirilmiştir. Yaptığımız çalışmanın sonuçları *H. pylori* kaynaklı hastalıkların tekrarlamasını önlemek amacıyla bakteriyle savaşmanın yanında içerisinde bakteri barındıran maya ile savaşmanın da hastalığın tekrarlaması açısından önemli olduğuna dikkat çekmektedir.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. İnsan Mikrobiyotasına Giriş

Funguslar ve bakteriler insan vücudunun tüm mukozal epitel yüzeylerinde bulunmaktadır. 19. yüzyıldaki keşiflerden sonra, uzun süre mikroorganizma varlığının çoğunlukla hastalıklarla ilişkili olduğu düşünülmüştür. Ancak 20. yüzyılın ikinci yarısında mikrobiyal dünya hakkında daha fazla bilgi edinilmesi ve antibakteriyel ve antifungal ilaçların kullanımının artmasıyla insanlar mikroorganizmaların yararlı rolünü anlamaya başlamışlardır. Bu alanda yapılan ilk keşifler arasında bağırsak bakterileri tarafından B12 vitamini üretimi veya vajinal laktobasillerin tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonlarına koruyucu etki göstermesi yer almaktadır (Albert vd., 1980; Bruce, 1973).

İnsan vücudunun farklı nişlerinde yaşayan bakteri topluluklarının sistematik analizi, dizileme tekniklerindeki gelişmelere bağlı olarak hızlanmıştır. Biyoinformatik, yeni nesil dizileme, daha önce laboratuvarında kültüre edilemeyen mikroorganizmaların tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Bu gelişmeler "insan mikrobiyomu projesine" yol açmıştır. Daha sonra karmaşık fungus topluluklarını ("mikrobiyom" olarak adlandırılır) analiz eden ilk çalışmalar yayınlanmıştır (Turnbaug vd., 2007; Ghannoum vd., 2010; Enaud vd., 2018). Günümüzde, insan vücudunun, kendisini oluşturan hücreler kadar mikroorganizma içerdiği ve mikrobiyal toplulukların, konukçu faktörlerinden etkilendiği yaygın olarak bilinmektedir. Mikrobiyotanın bakteriyel ve fungal üyeleri arasındaki etkileşimler sıklıkla rapor edilmektedir (Sender vd., 2016).

"Mikrobiyota"nın kökeni 1900'lü yılların başlarına kadar uzanabilmektedir. Bakteriler, mayalar ve virüsler de dahil olmak üzere çok sayıda mikroorganizmanın insan vücudunun çeşitli bölgelerinde (bağırsak, deri, akciğer, ağız boşluğu) bir arada bulunduğu bulunmuştur. Ayrıca "gizli organ" olarak da bilinen insan mikrobiyotası, tüm insan genomundan 150 kat daha fazla genetik bilgiye katkıda bulunmaktadır. Her ne kadar "mikrobiyota" ve "mikrobiyom" sıklıkla birbirinin

yerine kullanılsa da, iki terim arasında bazı farklılıklar vardır. Mikrobiyota, ağız ve bağırsak mikrobiyotası gibi tanımlanmış bir ortamda bulunan canlı mikroorganizmaları tanımlar. Mikrobiyom, yalnızca mikroorganizma topluluğunu değil aynı zamanda mikrobiyal yapısal elemanları, metabolitleri ve çevre koşullarını da içeren, ortamdaki tüm mikroorganizmaların total genomunu ifade eder. Bu bakımdan mikrobiyom, mikrobiyotadan daha geniş bir spektrumu kapsamaktadır (Hou vd., 2022).

İnsan vücudundaki funguslar uzun süre boyunca teşhis edilemediği için önemsenmemiştir. Özellikle bakterilerle birlikte izole edilen funguslar, enfeksiyonun sonucunu değiştirmedikleri veya çevresel kontaminasyondan kaynaklandıkları düşünüldüğü için genellikle önemsenmemiştir. Hasta materyalinden fungus ve bakterilerin birlikte izole edildiğini bildiren çalışmaların artması bu alana ilgiyi arttırmıştır. Çalışma bulguları, bakteri-fungus etkileşimlerinin enfeksiyonlar sırasında da meydana geldiğini göstermektedir (Krüger vd., 2019).

İnsanlarda bakteri-fungus etkileşimlerini ve bunların insan konukçusu üzerindeki etkilerini anlamak için kullanılan iki önemli deneysel strateji vardır. Birincisi, tüm mikrobiyal topluluklar sağlık ve hastalık bağlamında belirli türlerin varlığı ve göreceli bolluğu açısından analiz edilebilmektedir. İnsanlardaki çalışmalar çoğunlukla korelatif olsa da, hayvan modelleri mikrobiyal toplulukların daha spesifik bir şekilde manipüle edilmesine olanak tanımaktadır. İkinci stratejide, bakteri-fungus etkileşimlerine insan konukçusu dahil edilerek veya dahil edilmeden birebir incelenebilmektedir. Şimdiye kadar hem insanlar hem de hayvanlar için yayınlanan çalışmaların çoğunluğunda mikrobiyom veya mikrobiyom analiz edilmiştir. Aynı örnekten veya hastadan hem bakteri hem de fungusları analiz eden araştırmaların sayısı nispeten sınırlıdır. Gerçekleştirilen çalışmalar kanser, otoimmün hastalıklar, kistik fibroz (KF) veya organ nakilleri gibi çok çeşitli hastalıkları veya tedavi rejimlerini kapsamaktadır. Bu temel durumlar aynı zamanda fungal ve diğer fırsatçı enfeksiyonlar için risk faktörlerini temsil etmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı bu hastalardaki mikrobiyom ve mikrobiyom

analizleri, bakteriyel-fungal etkileşimlerin enfeksiyonların gelişimini etkileyip etkilemediğini ve/veya nasıl etkilediğini daha iyi anlamak için önemlidir (Drell vd., 2013; Botterel vd., 2018; Krüger vd., 2019).

Bir örnekten bakteri ve fungus topluluklarının eş zamanlı analizi zor olabilir çünkü analiz için daha fazla nükleik asit elde etmeye ihtiyaç vardır ve böylece hücrelerin tam anlamıyla parçalanması gerekmektedir. Fungusların ve bazı bakterilerin sert hücre duvarları nedeniyle, nükleik asitleri izole etmek için mekanik, kimyasal veya enzimatik lizis adımlarının dahil edilmesi gerekmektedir (Vesty vd., 2017). DNA izolasyon stratejisine ek olarak, amplifikasyon için primer seçimi, dizileme yaklaşımı ve ardından kullanılan taksonomik tanımlama ve veri tabanları analiz için önemlidir (Underhill ve Iliev, 2014). Bugüne kadar farklı çalışmalarda farklı yaklaşımlar kullanılmış ve ne bakteriler için ne de funguslar için ve bunların birlikteliği için belirlenmiş bir standart analiz protokolü bulunmamaktadır. Karmaşık mikrobiyal toplulukların analizinde teknik zorluklar olsa da mikrobiyotanın farklı üyeleri arasındaki etkileşimlerin konukçuların sağlığını ve hastalıklarını etkilediği bilinmektedir (Leclair ve Hogan, 2010; Peleg vd., 2010; Allison vd., 2016; Förster vd., 2016).

2.2. İnsan Mikrobiyota Üyeleri

Ağız boşluğu dış dünyayı sindirim sistemiyle birleştirmektedir ve insan vücudundaki en çeşitli mikrobiyal topluluklara ev sahipliği yapmaktadır. Ağız boşluğu, anatomisi dolayısıyla çeşitli mikroorganizmalar için uygun nişler sağlamaktadır. Tükürük, ağızda kalmayan ancak mideye daha fazla taşınan mikroorganizmaların büyümesini kolaylaştırmaktadır. Dil, ağız boşluğundaki fungus biyokütlesinin bulunduğu mukozal bir yüzeydir. Dişler, protezler ve oral implantlar, mikroorganizmaların dental plak adı verilen biyofilmler oluşturması için kararlı yüzeyler sağlamaktadır. Bu plaklar, diş eti çizgisinin üzerinde bulunan supragingival plak ve diş eti çizgisinin altında bulunan subgingival plak olarak ayrılabilir. Supragingival ve subgingival diş yüzeyleri mikroorganizmaların yerleşebilmesi için ağız boşluğundaki en uygun ortamlardır (Krüger vd., 2019). Ağız boşluğu; mikrobiyal gelişim için önemli olan nişasta ve lipitleri metabolize

edebilen ilk sindirim organıdır. Oral mikrobiyota, insan mikrobiyotasının benzersiz ve önemli bir parçasıdır ve insan ağız boşluğunda bulunan mikroorganizmaları içermektedir. Ağız boşluğunun insan vücudundaki ikinci en karmaşık mikrobiyotaya sahip olduğu ve çeşitli organizmaları içerdiği bilinmektedir. Ağız mikrobiyotası; ağız homeostazının korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Ağız boşluğundaki mikrobiyal büyüme, kişisel hijyen, beslenme ve bazı durumlarda sigara içmenin yanı sıra, ağız mikroorganizmaları üzerinde ek etkilere sahip olabilecek konukçu tarafından yönlendirilen genetik faktörler de dahil olmak üzere çeşitli değişkenlerden etkilenmektedir. Ağız boşluğunun nemli çevresi nispeten tutarlı bir sıcaklıkta (34-36° C), dalgalanan pH seviyelerindedir ve birçok faktör mikrobiyom değişkenliğini etkilemektedir (Zaura vd., 2015; Deo ve Deshmukh, 2019).

Oral mikrobiyotada; bakteriler ana oral mikroorganizmalardır. Oral bakteri topluluğu temel olarak *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* ve *Fusobacteria* olmak üzere altı ana filumdan oluşur ve taksonların yaklaşık %94'ü tanımlanabilmiştir. Diğer filumlar ise *Saccharibacteria*, *Synergistetes*, *Gracilibacteria*, *Chlamydia*, *Chloroflexi*, *Tenericutes* ve *Chlorobi* %6'sını oluşturmaktadır (Falsetta vd., 2014; Klimesova vd., 2018). İnsan mikrobiyota çeşitliliği sadece bakterilerle sınırlı olmayıp fungusları da kapsamaktadır. Funguslar oral mikrobiyotada hem fırsatçı patojenler hem de sağlıklı oral mikrobiyotanın üyeleri olarak bulunmaktadır. Sağlıklı insanlarda birçok fungus türünün bulunduğu bildirilmiş olup, en sık *Candida* türleri görülürken bunu *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Cryptococcus* takip etmektedir. En sık görülen *Candida* türü *C. albicans* olup, bunu *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* ve *Candida metapsilosis* takip etmektedir. Ağız mikrobiyotasının küçük bir kısmını Archaea oluşturmaktadır ve ağız mikrobiyotasında *Thermoplasmatales*, *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina* ve *Methanospaera* gibi yalnızca birkaç tür bulunmaktadır. Herpes virüsü gibi ağızda bulunan bazı virüslerin ağızda ve mukokutanöz yüzeylerde önemli hastalıklara neden olduğu ve yüz ve dudaklarda tekrarlayan, kronik lezyonlara neden olabileceği dikkate

alınmalıdır (Ghannoum vd., 2010; Dridi bd., 2011; Dupuy vd., 2014; Falsetta vd., 2014; Klimesova vd., 2018; Moissl-Eichinger vd., 2018).

Vajina mikroorganizma çeşitliliği bakımından oldukça zengin bir bölgedir. Sağlıklı kadınların vajinal mikro ve mikrobiyotasının bileşimi zamansal olarak değişmektedir. Adet, gebelik ve sağlık durumuyla ilişkili olarak değişkenlik göstermektedir. Vajina üreme dönemlerindeki, yüksek glikojen ve besin seviyeleriyle, düşük pH'sı ile (<4,5) laktik asit üreten laktobasillerin kolonizasyonuna ve baskınlığına izin vermektedir. Doğurganlık çağındaki sağlıklı kadınların vajinal yolu esas olarak patojenlere karşı ilk savunma hattı olan *Lactobacillus*'tan oluşmaktadır. Ek olarak, dişi üreme sisteminin iç kısmında fungal topluluklar da bulunmaktadır. Vajinal kesitlerde belirlenen üç fungus filumu *Ascomycota* (burada *Candida* ana cinstir), *Basidiomycota* ve *Oomycota*'dır. Birçok çalışma, vajinadaki fungus mikrobiyotasının bileşiminin büyük önem taşıdığını, çünkü bu mikrobiyotanın bozulmasının birçok vajinal enfeksiyonun ana nedeni olduğunu rapor etmiştir. Bu enfeksiyonlar bakteriyel vajinoz, vulvovajinal kandidiyazis, aerobik vajinit, klamidy enfeksiyonu, bel soğukluğu ve insan bağışıklık yetersizliği virüsü (HIV) dahil cinsel yolla bulaşan diğer hastalıkları içermektedir. Bakteriyel vajinoz ve vulvovajinal kandidiyazis, kadın üreme sistemini etkileyen en belirgin enfeksiyonlardır (Anderson, 2004; Marrazzo vd., 2011; Guo vd., 2012). Doğal vajinal mikrobiyota esas olarak *Lactobacillus*, *Gardnerella*, *Atopobium*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Ureaplasma*, *Escherichia*, *Mycoplasma*, *Staphylococcus*, *Candida*, *Megasphaera* ve diğer birçok cinsten oluşmaktadır. Bunlar arasında *Lactobacillus* spp, vajinal mikrobiyotanın sağlıklı bir ortam sağlayan hayati bir üyesidir. *Candida* türleri vajinal mikrobiyotalarının normal üyeleridir (Fuochi vd., 2017; Hameed vd., 2021).

Bağırsak ve gastrointestinal sisteminde bağırsak lümeninde yüksek yoğunlukta mikroorganizma bulunmaktadır. Bağırsak, besin ve suyun emilimini kolaylaştıran organdır. Bağırsaktaki yarı geçirgen bariyer, esas olarak mukus üreten goblet hücreleri, paneth hücreleri ve bağışıklık hücreleri ile tamamlanan bağırsak epitel hücreleri (enterositler) tarafından oluşturulmaktadır. Enterositler ve paneth

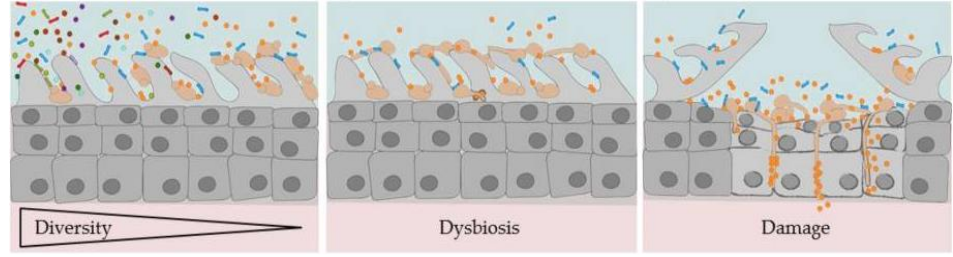
hücreleri, bağırsak lümenine sürekli olarak salgılanan antimikrobiyal peptitler üretmektedir. İlginç bir şekilde, mikroorganizmaların çoğu enterositlerin üzerindeki mukus tabakasında bulunmaktadır ve konukçu ile doğrudan teması yoktur. Makrofajlar, plazma hücreleri ve lenfositler de dahil olmak üzere çoğu bağışıklık hücresi enterositlerin altındaki lamina propriada yer alırken, dendritik hücreler bağırsak lümeni ile lamina propria arasındaki boşluğu köprüleyerek bunları algılar, farklı mikroorganizmaları birbirinden ayırır ve bağışıklık tepkisini azaltır veya teşvik eder. İnsan bağırsağı ve gastrointestinal system mikrobiyotası, çeşitli bakteri, fungus ve arke türlerinden oluşmaktadır. Bağırsak, konukçuyla simbiyotik ilişkilerinde metabolizmaya ve sindirime yardımcı olan milyarlarca mikroorganizma için çok iyi bir niştir. Birçok rapor, bağırsak mikrobiyomunun bakteri topluluklarının aksine daha az fungus yüküne sahip olduğunu göstermiştir. Funguslar gastrointestinal sistemdeki mikroorganizmaların yaklaşık %0,1'ini oluşturur ve funguslar, bakteriler ve virüsler arasında antagonistik ve sinerjistik ilişkiler gerçekleşmektedir. Yetişkin bireyin bağırsak mikrobiyomunda yaklaşık 10^{14} bakteri bulunur. Bağırsakta yaşayan mikroorganizmalar, konağın diğer bölümlerinin mikrobiyotasıyla bağlantılı mikroorganizmalardan farklıdır. Bağırsak mikrobiyotasını inceleyen İnsan Bağırsak Sisteminin Metagenomu Projesi (MetaHIT) ve Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) İnsan Mikrobiyomu Projesi gibi birçok büyük ölçekli proje, bağırsakta mevcut bakteriyel mikrobiyotanın bolluğu ve çeşitliliği nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Peterson vd., 2010; Wang vd., 2014).

Sağlıklı kişilerin bağırsağında bulunan bakterilerin çoğunluğu *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* (%70-90'ı toplanır) filumu üyeleridir ve daha az oranda da *Actinobacteria* ve *Proteobacteria* filumuna ait türler bulunmaktadır. Bu filumlar insan bağırsağının çekirdek mikrobiyotasını temsil etmektedir. Bağırsak ekosisteminde oksijen seviyeleri, pH değişiklikleri veya makro ve mikro besinlerdeki değişiklikler gibi çeşitli faktörler bakteri ve fungus türlerinin çeşitliliğini ve bolluğunu etkilemektedir. Bağırsak mikrobiyotası besinlerin ve suyun emilmesine yardımcı olur ve yarı geçirgen bir bariyer esas olarak enterositler (bağırsak epitel hücreleri) tarafından oluşturulur. Ascomycota ve Basidiomycota, sağlıklı bireylerin bağırsak mikrobiyotasında tanımlanan yaygın taksonlardır ve

önde gelen cinsler *Saccharomyces*, *Candida*, *Malassezia* ve *Cladosporium*'u içermektedir. İnsanların gastrointestinal (GIS) sisteminde en sık bulunan bakteri türleri arasında *Clostridium*, *Streptococcus* ve *Bacteroides* yer almaktadır. Kolon, lif gibi sindirilmeyen gıdaların bakteriyel fermantasyonu için önde gelen bölgedir. Yapılan çalışmalarda *Ascomycota*, *Basidiomycota* ve *Chytridiomycota* filumlarına ait fungusların yaygın olduğu rapor edilmiştir. *Candida* ve *Saccharomyces* cinsleri sınırlı sayıda bulunmaktadır. *Candida* türlerinin GIS kanalındaki kolonizasyonunu ve büyümesini indükleyen beslenme faktörü, besinlerdeki amino asitler, proteinler ve yağ asitleri değil, çoğunlukla besinlerdeki karbonhidratlardır (Wheeler vd., 2016; Hameed vd., 2021).

Burun ve nazofarenks, birlikte nazofaringeal mikrobiyotayı oluşturan ortak ve potansiyel patojenik türlerin kolonize ettiği nişlerdir. İnsanlarda ve memelilerde burun boşluğunun, çeşitli bakteri ve fungus türlerinin kolonizasyonu için önemli bir bölge olduğu iyi bilinmektedir. Nazofaringeal (NP) mikrobiyota profilleri erken gelişim sırasında stabil değildir ve mikrobiyota, gelişim meydana geldikçe değişmektedir. Örneğin, bebeklerde NP mikrobiyotası büyük ölçüde *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* ve *Fusobacteria* filumları ile karakterize edilir; en belirgin cinsler *Moraxella*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Dolosigranulum*, *Corynebacterium* ve *Neisseria*'dır. Yetişkinlerde tespit edilen cinsler *Staphylococcus*, *Haemophilus* ve *Streptococcus*, *Sphingobacterium*, *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Rothia* ve *Propionibacterium*'dur. NP mikrobiyotasında bulunan fırsatçı fungal patojenler olarak kabul edilen 25 maya türünün 20'si *Candida* türlerinden oluşmaktadır (Palacio vd., 2009; Bogaert vd., 2011).

Mikrobiyotadaki mikroorganizmaların dengesinin bozulması disbiyozis olarak adlandırılmaktadır. Bu durum konukçuyu önemli ölçüde etkilemektedir. Yüksek çeşitlilik homeostazisinden düşük çeşitlilik disbiyozuna geçiş, birçok bakteri ve fungusun metabolik durumunu ve virülans potansiyelini değiştirmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Disbiyozisten hasara geçiş (Krüger vd., 2019)

Spesifik olarak, mikroorganizma toplulukları insan vücudundaki normal fizyolojik fonksiyonların sürdürülmesinde çok önemli roller oynamaktadırlar. Mikrobiyotanın disbiyozu, inflamatuvar bağırsak hastalığı, irritabl bağırsak sendromu, diyabet, obezite ve alerjiler dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkilidir (Turnbaugh vd., 2009; Schwabe ve Jobin, 2013; Belkaid ve Hand, 2014; Tig ve Moschen, 2014; Helmink vd., 2019; Liu vd., 2020; Caruso vd., 2020; Jeffery vd., 2020).

Kommensal mikroorganizmalar doğum, beslenme ve farklı ortamlara maruz kalma aracılığıyla edinilebilir ve dolayısıyla bireyin yaşamı boyunca gelişimi ve sağlığı üzerinde derin bir etkiye sahip olabilirler (Ferretti vd., 2018; Vangay vd., 2018). Mikrobiyotanın insan sağlığının korunmasında önemli rol oynayan kommensal üyelerinin yanında çeşitli patolojilere neden olabilen birçok mikroorganizma da vardır (Peleg vd., 2010). Patojenler, birincil patojenler ve fırsatçı patojenler olarak sınıflandırılmaktadır. Patojen mikroorganizmalar, konukçuda hastalık yapma yeteneğine sahip mikroorganizmalardır. Shiga toksini olarak bilinen bir virülans faktörü üreten enterohemorajik *E. coli* (EHEC) patojen mikroorganizmalara örnek verilebilmektedir. Bu toksin, protein sentezini engelleyerek ciddi ve kanlı ishal, iltihaplanma ve böbrek yetmezliğine yol açmaktadır; bu, sağlıklı bağışıklık sistemine sahip hastalarda bile gerçekleşebilmektedir. Fırsatçı patojen, normalde insan konukçusunda bulunan ancak bağışıklık sisteminin zayıfladığı, mikrobiyal dengenin bozulduğu veya vücudun normal savunma mekanizmalarının zarar gördüğü durumlarda hastalığa yol açabilen patojenlerdir. Fırsatçı enfeksiyonlara duyarlı bireyler arasında yaşlılar, hamile kadınlar, kemoterapi gören hastalar, bağışıklık yetmezliği olan kişiler

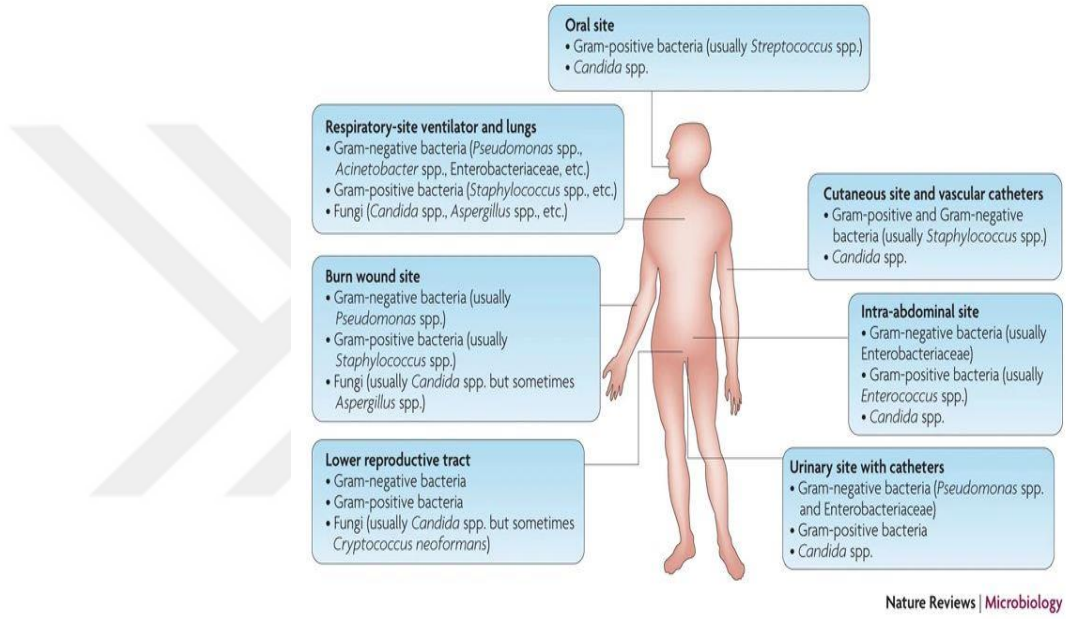
(örneğin, edinilmiş bağışıklık yetmezliği sendromu [AIDS]), ameliyat sonrası dönemdeki hastalar vb. bulunmaktadır. *Staphylococcus epidermidis*, hastane enfeksiyonlarının en sık nedenlerinden biri olan fırsatçı bir patojendir. *S. epidermidis*, genellikle virülans göstermeyen ciltteki normal mikrobiyota üyelerindendir. Ancak hastanelerde, kateterler, implantlar veya cerrahi operasyonlar sırasında vücuda yerleştirilen diğer cihazlar üzerinde oluşan biyofilmlerde de büyüebilmektedir. Vücuda girdikten sonra, *S. epidermidis* endokardit gibi ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir ve bu tür enfeksiyonların devamını sağlayan virülans faktörleri üretmektedir (Otto, 2009).

Normal mikrobiyotanın bazı üyeleride belirli koşullar altında fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu genellikle, bir vücutta zararsız bir şekilde yaşayan mikroorganizmaların, hastalığa neden oldukları farklı bir vücut sistemine geçmesiyle gerçekleşmektedir. Örneğin, normalde kalın bağırsakta bulunan *E. coli*, mesaneye girerse idrar yolu enfeksiyonuna neden olabilmektedir. Bu durum, kadınlar arasındaki idrar yolu enfeksiyonlarının başlıca nedenidir. Normal mikrobiyota üyeleri ayrıca, vücudun çevresindeki bir değişikliğin belirli bir mikroorganizmaların aşırı büyümesine yol açtığında da hastalığa neden olabilmektedir. Örneğin *Candida* popülasyonu diğer mikrobiyota organizmaları tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Ancak, bir birey antibakteriyel ilaçlar alıyorsa, normalde *Candida*'nın büyümesini inhibe eden bakteriler öldürülebilmektedir. Böylece *Candida* popülasyonunda ani bir artış gözlenmektedir, çünkü fungus antibakteriyel ilaçlardan etkilenmemektedir.

2.3. Bakteriyel Fungal Etkileşimler

İnsan mikrobiyom çalışmaları bakteri türlerine odaklanırken, dizileme teknolojisindeki gelişmeler anatomik bölgelerdeki mikrobiyal toplulukların diğer üyelerinin tanımlanmasını ve karakterizasyonunu kolaylaştırmıştır (Xu ve Dongari-Bagtzoglou, 2015; Paterson vd., 2017; Bradford ve Ravel, 2017; Li vd., 2018; Kapitan vd., 2019; Kalia vd., 2020). İnsan vücudu mikroorganizmaların birbirleriyle ve konukçuyla etkileşime girdiği bir nişi oluşturmaktadır. Yapılan

çalışmalarda ağız boşluğu, nazofaringeal bölge, cilt, vajinal bölge vb. anatomik bölgelerde bakteriler ve fungusların aralarında etkileşimler kurdukları rapor edilmiştir (Wang ve diğerleri, 2020) (Şekil 2.2). Anatomik bölgelerdeki bakteriyel-fungal etkileşimlerin derinlemesine analizi ve etkileşim mekanizmalarının aydınlatılması insan sağlığı açısından çok önemlidir.



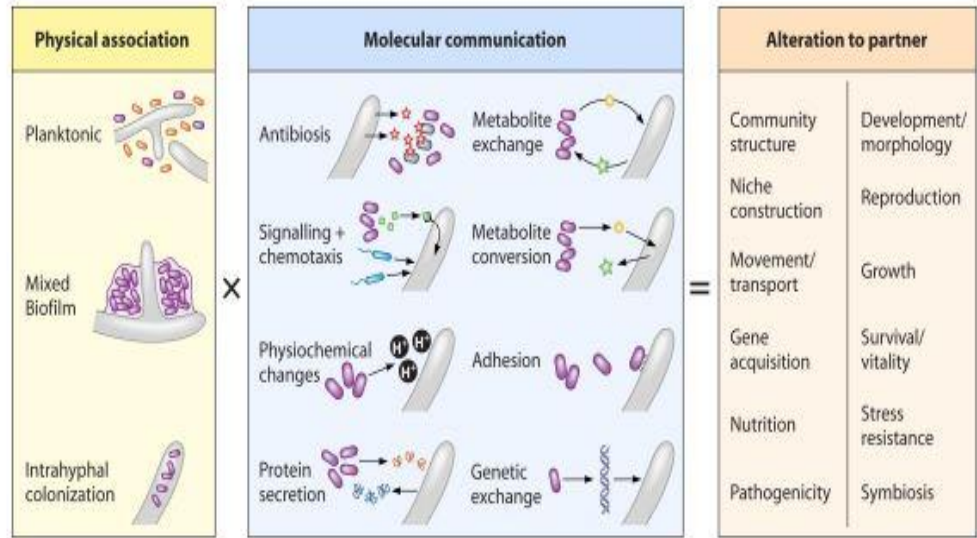
Şekil 2.2. Bakteriyel-fungal etkileşimler için klinik açıdan önemli anatomik bölgeler (Peleg vd., 2010)

Birkaç yeni yayında, insan konukçusu açısından önem taşıyan bakteri-fungus etkileşimleri gözden geçirilmiştir (Briard ve diğerleri, 2019; Kapitan ve diğerleri, 2019; Kumari ve Singh, 2019; Mayer ve Kronstad, 2019; Montelongo-Jauregui ve Lopez-Ribot, 2018; Negrini ve diğerleri, 2019; Nogueira ve diğerleri, 2019 ; Santus ve diğerleri, 2021; Steffan ve diğerleri, 2020; Wang ve diğerleri, 2020). İnsan vücudundaki bakteriyel-fungal etkileşimlerin kommensal mi, simbiyotik mi, patojenik mi olduğunu bilmek insan sağlığı açısından önem taşımaktadır.

Bakteriyel-fungal etkileşimler pozitif etkileşimler ve negatif etkileşimler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Pozitif etkileşimler mutualizm, sintrofizm, proto-iş birlikleri ve kommensalizmi içermektedir. Negatif birliktelikler antagonizm, parazitizm, predasyon, rekabeti içermektedir. Mutualistik ilişki etkileşim halindeki her mikroorganizmanın birliktelikten fayda sağladığı ilişki olarak tanımlanmaktadır. Mutualist ve konukçunun metabolik olarak birbirine bağımlı olduğu bir ilişkidir. Mutualizm etkileşim halindeki mikroorganizmalar arasında yakın fiziksel teması gerektirmektedir. Bu etkileşim mikroorganizmaların her iki türün tek başına işgal edemeyeceği bir habitatta var olmasına izin vermektedir. Mikroorganizmalar arasındaki karşılıklı ilişki, onların tek bir organizma gibi hareket etmelerine olanak tanımaktadır. Sintrofizm bir organizmanın büyümesinin başka bir organizma tarafından sağlanan substrata bağlı olduğu veya bu substrat tarafından geliştirildiği bir etkileşim halidir. Sintrofik ilişkide her iki organizma birbirinden faydalanmaktadır. Kommensalist etkileşim birliktelikteki organizmalardan birinin yarar sağladığı, diğerinin ne yarar ne de zarar gördüğü bir ilişkidir. Bu tek yönlü bir birlikteliktir ve kommensal konukçudan ayrılırsa hayatta kalabilmektedir. Ammensalizm veya antagonizm olarak isimlendirilen ilişkide bir mikrobiyal popülasyon, diğer mikrobiyal popülasyonu inhibe eden maddeler üretmektedir. İnhibe edici maddeler üreten ilk popülasyon etkilenmez veya diğer popülasyonlar engellenirken rekabet kazanabilmektedir ve habitatta hayatta kalabilmektedir. Vajinal kanaldaki normal mikrobiyota üyeleri tarafından üretilen laktik asit, *C. albicans* gibi birçok patojen organizmayı inhibe etmesi antagonistik ilişkilere örnek olarak verilebilmektedir. Rekabet, iki mikrobiyal popülasyon arasında, her iki popülasyonun da hayatta kalma ve büyüme açısından olumsuz etkilendiği negatif bir ilişkiyi temsil etmektedir. Rekabet, her iki popülasyonun aynı alanı veya aynı besinleri kullanması durumunda ortaya çıkmaktadır, böylece mikrobiyal popülasyon daha düşük yoğunluğa veya büyüme hızına sahip olmaktadır. Mikrobiyal popülasyon karbon kaynağı, azot kaynağı, fosfor, vitaminler, büyüme faktörleri vb. gibi büyümeyi sınırlayan her türlü kaynak için rekabet edebilmektedir. Rekabet, her iki popülasyonun da tam olarak aynı ekolojik nişi işgal etmesini engellemektedir; çünkü biri rekabeti kazanırken diğeri kaybetmektedir. Parazitizm Bir popülasyonun (parazitin) faydalandığı ve besinini

zarar gören birliktelikteki diğer popülasyondan (konukçu) karşıladığı bir ilişkidir. Konukçu-parazit ilişkisi, fiziksel temas veya metabolit üretimi ile gerçekleşebilmektedir. Bazı parazitler, ektoparazit olarak bilinen konukçu hücrenin dışında yaşarken; diğer parazitler, endoparazit olarak bilinen konukçu hücrenin içinde yaşamaktadır. Predasyonda bir organizmanın (avcı) diğer organizmaları (av) yutması veya saldırması gerçekleşmektedir. Av, avcıdan daha büyük veya daha küçük olabilir ve bu ilişki avın ölümüyle sonuçlanmaktadır (Weiland-Bräuer, 2021).

Bakteriyel-fungal etkileşimler (BFI); her iki mikroorganizmanın fiziksel olarak etkileşime girdiği, birbirlerinin metabolitlerini değiştirdiği veya bunlara tepki verdiği biyofilmlerde yaygın olarak çalışılmıştır. Doğrudan fiziksel etkileşimlerini incelemek, organizmanın hayatta kalması, sekonder metabolitlerin üretimi (klinik ilaçlar, fungusitler, prebiyotikler vb.), organizmaların farklı ortamlara yayılması ve bu tür etkileşimleri kolaylaştıran mekanizmaların belirlenmesi hakkında bilgi vermektedir. Bu fiziksel etkileşimler, mikrobiyal partnere, BFI'nın konukçusuna (varsa) ve büyüme için gerekli olan substrata bağlı olabilmektedir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Bakteriler ve funguslar arasındaki fiziksel ilişkiler ve moleküler etkileşimler (Frey-Klett vd.2011)

Bakteriler ve funguslar farklı şekillerde etkileşime girmektedirler. Doğrudan bağlanma fiziksel etkileşime yol açmaktadır. Metabolik yan ürünler veya quorum sensing molekülleri gibi kimyasal bileşiklerin salınması sınırlı bir ortamda iletişimi sağlamaktadır. Oksijen tüketimi veya protonların salınması yerel ortamı etkilemektedir. Bakteriler ve funguslar belirli bir nişteki besinler veya adhezyon bölgeleri için rekabet etmektedir. Çoğalmak amacıyla karışık biyofilmler oluşturmaktadırlar.

İnsanların fungal patojenleri, konağın enfeksiyonu sırasında büyümeyi ve hayatta kalmayı kolaylaştırmak için bir dizi adaptif mekanizma ve virülans faktörü kullanmaktadır. Bunlar arasında proteaz ve toksinlerin salgılanmasının yanı sıra yapışmaya, konukçu dokuya nüfuz etmeye ve konukçu bağışıklık sisteminden kaçmaya yardımcı olan çeşitli morfolojik durumlar arasında geçiş yapılması yer almaktadır. Kommensal ve patojenik bakteriler, fungal patojenlerin virülansını etkileyerek, fungusların gelişmesi ve konukçuda hastalığa neden olma yeteneğini modüle ederek aynı zamanda konukçunun funguslara verdiği tepkiyi etkileyebilmektedir (Hameed vd., 2021). Son yıllarda mikrobiyal etkileşimlerin sağlık ve hastalık üzerindeki etkisi giderek daha fazla kabul görmeye başlamıştır ve bunun sonucunda birçok araştırmacı prokaryotlar ve ökaryotlar arasındaki tarihsel ayrımı geride bırakarak, gruplar arasındaki ortak kolonizasyon ve ortak enfeksiyonları araştırmaya başlamıştır.

Aşağıdaki bölümde insan vücudundaki farklı bölgelerdeki bakteriyel-fungal etkileşimler ayrıntılı olarak açıklanacaktır.

2.4.İnsan Sağlığı Açısından Önemli *Candida*-Bakteri Etkileşimleri

İnsan vücudunda sıklıkla konukçu sağlıklı durumdan hastalıklı duruma geçişini etkileyen bakteriyel ve fungal etkileşimler meydana gelmektedir. Gerçekleştirdiğimiz tez çalışması *Candida albicans-Helicobacter pylori* birlikteliği üzerine olduğu için aşağıda özetlenen örnekler *Candida*-bakteri ilişkileri üzerine odaklanmıştır. İlk olarak *Candida* genusu ile ilgili genel bilgiler açıklanıp, insan

vücudundaki oral, vajinal, gastrointestinal ve nazofaringeal bölgelerdeki *Candida*-bakteri etkileşimlerinden bahsedilmiştir.

Candida spp.

Candida türlerinin neden olduğu invazif fungal enfeksiyonlar, diyabet, AIDS, kanser, organ nakilleri, kortikosteroidler, ameliyat sonrası bakım, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı gibi nedenlerle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde hayatı tehdit etmektedir. Fungal enfeksiyonlar sistemik hale gelerek ve hastalığın devam etmesiyle derin yerleşimli enfeksiyonlara neden olabilmektedirler (Shoham ve Levitz, 2005; Hazen, 2005; Hameed vd., 2021).

Candida albicans insanlarda kandidiyazis vakalarının yarısından fazlasından sorumludur. Son yirmi yılda, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* gibi *Candida albicans* dışı birçok *Candida* (NCAC) türü de klinik öneme sahip önemli patojenler olarak ortaya çıkmıştır (Hazen, 2005; Hameed vd., 2021). İnsan enfeksiyonlarıyla ilişkilendirilen *Candida* türleri yelpazesindeki bu çeşitlilik, kandidiyazisin tanı ve tedavisinde, virülans ve biyolojisi çalışmalarında hastalığın araştırılmasında zorluğa neden olmaktadır. *Candida* türlerinin patogenezi; mayadan hif formuna geçiş olarak bilinen dimorfizm, fenotipik değişim, biyofilm oluşumu, adezyon ve invazyon, fagositozdan kaçış, konukçu immün kaçışı, antifungal ajanlara direnç ve yerleşik mikrobiyota ile etkileşimi içeren çeşitli faktörler tarafından yönetilmektedir. (Abacı, 2011).

C. albicans, konukçu nişinde, çeşitli fungal fenotipik özellikleri etkileyen bakteriyel kommensallerle etkileşime girmektedir (Peleg vd., 2010; MacAlpine vd., 2022). Pek çok bakteri türü *C. albicans*'ın büyümesini engellerken, diğer bakteriler, hifal gelişim ve biyofilm oluşumu da dahil olmak üzere fungusun virülans özelliklerini engelleyen faktörler salgılamaktadır (Förster vd., 2016; Nogueira ve diğerleri, 2019). Buna karşılık, bazı bakteriler fungus büyümesini teşvik etmektedir ve *C. albicans*'ın virülans özelliklerini geliştirmektedir. *C. albicans*'ın kommensalizmini ve patogenezi etkileyen faktörlerin ve koşulların

tam olarak anlaşılması, bu organizmanın hastalığa nasıl neden olabileceğini anlamak açısından kritik öneme sahiptir.

C. albicans'ın konukçuda çoğalma yeteneği, fungusun yüksek sıcaklıklara, alternatif karbon kaynaklarına, reaktif oksijen türlerine, hücre duvarı stresörlerine ve çeşitli pH aralıklarına maruz kalmak dahil olmak üzere elverişsiz koşullara karşı uyum sağlama yeteneğine dayanmaktadır (Brown vd., 2012).

2.4.1 Ağız boşluğundaki *Candida*-bakteri etkileşimleri:

C. albicans, disbiyozis sırasında ağız boşluğunda en sık bulunan fungustur. *C. albicans*, insan ağzında mukozal ve protez yüzeylerinde kolonize olurken, oral *Streptococcus* türleri ile etkileşime girmektedir ve bu da karmaşık mikrobiyal toplulukların oluşumuna yol açabilmektedir. *Streptococcus mutans* diş çürüklerinde ve diş plaklarında bulunan en baskın bakteri türüdür (Gross vd., 2012). Bu Gram-pozitif, karyojenik bakteriler diş yüzeyindeki polimikrobiyal biyofilmlerde mevcuttur. Glukoziltransferaz B (GtfB) enzimi, *S. mutans*'ın patojenitesinde kritik rol oynamaktadır. Streptokokal glukoziltransferazlar (Gtfs) tarafından sentezlenen glukanlar olan ekzopolisakkaritler, diş yüzeyinde mikroorganizmaların birikmesini ve patojenik biyofilmlerin oluşmasını teşvik eden bağlanma bölgeleri sağlar. Çocukluk dönemindeki çürük diş plaklarında hem *S. mutans* hem de *C. albicans*'ın bulunması bu mikroorganizmalar arasındaki etkileşimlerin hastalığı etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Tükürük kaplanmış disklerle yapılan in vitro deneyler, *C. albicans*'ın *S. mutans* virulans genlerinden glikosiltransferaz B (GtfB) ifadesini artırdığını göstermiştir. GtfB, α -glukanların üretimini katalize eder ve *C. albicans*'ın yüzeyindeki mannanlara bağlanarak dış hücre matrisinin oluşumunu teşvik etmektedir (Hwang vd., 2017). GtfB aynı şekilde *C. albicans*'ın dışına yapışabilir, diş yüzeylerine yapışmayı teşvik edebilir ve karışık biyofilmlerin gelişimini teşvik edebilir. Ortak kültürler üzerinde gerçekleştirilen RNA-Seq analizi, *C. albicans*'ın *S. mutans*'taki karbonhidrat sindirim yollarını etkilediğini ortaya çıkarmıştır.

Lactobacillus salivarius birçok türle birlikte biyofilm oluşturmaktadır ve böylece *S. mutans* ve *C. albicans* biyofilmlerinin in vitro gelişimini engelleyebilmektedir (Krzysciak vd., 2017). Falsetta ve diğerleri tarafından yapılan deneyler, eksopolisakkaritlerin (EPS) karmaşık biyofilm oluşumundaki ana arabulucu olduğunu belirlemiştir. EPS'nin ayrıca fluconazol adlı antifungal ilacını in vitro olarak seketre ettiği ve bu durumun *C. albicans*'ın biyofilmde ilaç toleransını arttırdığını göstermiştir (Falsetta vd., 2014).

Fare modeli çalışmasında oral boşlukta *C. albicans*'ın ortaya çıkmasında *S. oralis*'in etkisi olduğu rapor edilmiştir. Birlikte enfeksiyon *C. albicans*'ın derin organ yayılımını desteklemiştir. *Streptococcus sanguinis*, *C. albicans* ile sinerjistik etkiler göstermiştir. *Streptococcus sanguinis*; *Porphyromonas gingivalis* ve *Prevotella intermedia* 'ya karşı antibakteriyel aktivite gösteren ve *Candida* türlerinin hifal gelişimini etkileyen bir bakteriyosin üretmektedir (Bamford vd., 2009; Zheng vd., 2016; Xu vd., 2016).

C. albicans ve *Fusobacterium nucleatum*, çeşitli oral polimikrobiyal enfeksiyöz hastalıklarda rol oynayan patojenik potansiyele sahip mikroorganizmalardır. Son zamanlarda, *F. nucleatum* ATCC 23726 suşunun *C. albicans* SN152 suşu ile koagreg olduğu rapor edilmiştir. Bu sürece fusobakteriyel membran proteini RadD ve *Candida* hücre duvarı proteini Flo9 aracılık etmektedir. *F. nucleatum* *C. albicans*'ın büyümesini ve hifal morfogenezini engellemektedir. Fare hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, *Candida* hifal morfogenezinin *F. nucleatum* tarafından inhibisyonunun, *C. albicans*'ın hayatta kalmasını engellediği ve *C. albicans*'ın makrofaj öldürme kapasitesini olumsuz yönde etkilediği rapor edilmiştir. Çalışmada, *C. albicans* ve *F. nucleatum* arasındaki etkileşimin, ağız boşluğunda uzun vadeli komensal bir yaşam tarzını teşvik etme işlevi görebilecek karşılıklı bir virülansa yol açtığını öne sürmektedir (Bor vd., 2016).

C. albicans ve anaerobik *Porphyromonas gingivalis*'in standart oksijen koşullarında birlikte kültüre edilmesi, *C. albicans* biyofilminin varlığında *P.*

gingivalis'in büyümesini arttırmaktadır; bu, *P. gingivalis*'in aerobik koşullar altında korunduğunu göstermektedir (Karkowska-Kuleta vd., 2018). *C. albicans* hem aerobik hem de anaerobik koşullarda büyüebilmesinin yanı sıra yakın çevredeki oksijen konsantrasyonunu azaltma yeteneğine de sahiptir ve böylece anaerobik bakterilerin ve mikroaerofilik bakterilerin büyümesini destekleyen mikroçevrenin gelişimini kolaylaştırmaktadır. *P. gingivalis*, metabolizmasını yaklaşık %6 oksijen konsantrasyonundaki mikroaerofilik koşullara adapte etme yeteneğine sahiptir ; bu nedenle, bakteriyel hücrelerin fungal biyofilmin karmaşık ve heterojen yapısı içinde lokalizasyonu, bakterilerin başarılı bir şekilde büyümesi ve çoğalmasını desteklemektedir (Karkowska-Kuleta vd., 2018).

Ağız boşluğunun yerleşik mikrobiyotasının bir kısmını oluşturan *Actinomyces* türleri, normal insan mikrobiyotasının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır ve ağız mikroeekolojik dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Bazı araştırmalar diş yüzeylerinin ve mukozanın *Actinomyces* tarafından kolonizasyonunun plak bakterilerinin sayısını ve çeşitliliğini arttırdığını ve aralarındaki etkileşimi teşvik ettiğini göstermiştir. *Actinomyces* türleri, nikkomycin ve geldanamisin dahil olmak üzere bazı antifungal materyaller üretebilmektedir. Bu nedenle oral *Actinomyces*'in oral *Candida* ile antagonistik bir ilişki kurabileceğini düşünülmüştür. Oral *Actinomyces*' in, *C. albicans*'ın çoğalması, yapışması, metabolik enzim aktivitesi, hif oluşumu ve biyofilm gelişimi üzerinde önleyici etkileri olduğu rapor edilmiştir (Guo vd., 2015; Hameed vd., 2021). *A. viscosus*, *A. naeslundii* ve *A. odontolyticus* gibi *Actinomyces* türlerinin *C. albicans*'ın büyümesini kısıtlayabildikleri ve *C. albicans*'ın oral epitel hücrelere yapışmasını azaltabildikleri rapor edilmiştir (Guo vd., 2015).

Oral ortamlarda *C. albicans*, kendisinin çoğalmasını engelleyen laktik asit ve diğer zayıf organik asitleri salgılayan *Lactobacillus* spp. ile etkileşime girmektedir (Ballou vd, 2017; Lourenco vd., 2019). Ayrıca *Lactobacillus* spp. fungusun büyümesini engelleyen siklik dipeptitler salgılamaktadır (Kwak vd., 2014). Mikroorganizmalar arasındaki bu etkileşim sağlıklı bir fizyolojik durumun sürdürülmesinde önem taşımaktadır. Çünkü önemli *Lactobacillus* türlerinin

kolonizasyonun az olduğu bireyler, vulvovajinal kandidiyazis açısından yüksek risk altındadır. *Lactobacillus* spp.'nin yanında, oral mukozada bulunan diğerkommensal bakteriler, *Actinomyces israelii* ve *P. aeruginosa*'nın yanı sıra yüksek konsantrasyonlarda *Prevotella nigrescens* ve *Porphyromonas gingivalis* dahil olmak üzere ortak kültür analizlerinde *C. albicans* büyümesini inhibe ettiğigörölmüştür (Thein vd., 2006).

Oral kandidiyazis ile ilişkili diğerk *Streptococcus* türleri *S. oralis*, *S. sanguinis* ve *S. gordonii*'dir. *S. mutans* ile karşılaştırıldığında, bu bakterilerin enfeksiyonlar sırasında *C. albicans* ile sinerjik olarak etkileşimde bulunarak oral kandidiyazis şiddetini arttırdığı gösterilmiştir. Bu streptokokların varlığı, *C. albicans*'ın ağız mukozası organoid modellerinde invazyonunu artırmıştır. Öte yandan, *C. albicans*, cansız yüzeylerde ve ağız ortamını taklit eden hücre sistemi içindeki ağız mukozası analogunun yüzeyinde streptokok biyofilm oluşumunu teşvik etmiştir. Ayrıca, bir fare ağız ko-enfeksiyon modeli, *C. albicans* varlığında *S. oralis*'in kolonizasyonunun arttığını doğrulamıştır. Bakteriler tek başına patojenik olmasada, ko-enfeksiyonlarda biyofilm oluşumu artmış ve oral kandidiyazis lezyonlarının sıklığı ve boyutu çoğalmıştır. Ek olarak, ko-enfeksiyon, *C. albicans*'ın derin organlara yayılmasını teşvik etmiştir (Diaz vd., 2012; Xu vd., 2013).

Oral mukozanın *Streptococcus oralis* kolonizasyonu ayrıca biyofilm oluşumunun artmasına, farelerde *C. albicans*'ın yayılmasının artmasına ve proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun artmasına yol açarak doku enflamasyonunun ve immünopatogenezin artmasına neden olmaktadır (Xu vd., 2014). *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces odontolyticus* ve *Actinomyces viscosus* dahil olmak üzere oral mikrobiyotanın diğerk bakteriyel üyeleri de biyofilm oluşumunun erken aşamalarında *C. albicans* virölansını arttırmaktadır (Morse vd., 2019).

2.3.2. Vajinal bölgedeki *Candida*-bakteri etkileşimleri:

C. albicans, vajinal kandidiyazisin önde gelen nedenidir (Foxman vd., 2000) ve *Lactobacillus* spp. dahil olmak üzere vajinal mukozadaki kommensal bakterilerle etkileşime girmektedir (Pendharkar vd., 2015; Vrbanac vd., 2018).

Lactobacillus spp.'nin *C. albicans* morfogenezini etkileme yeteneği, beyaz-opak hücre tipi değişimine bağlıdır. *C. albicans*'ın beyaz hücrelerinin *Lactobacillus* spp. ile etkileşimi incelenmiştir. *Lactobacillus rhamnosus* GG tarafından üretilen ve fungus hücre duvarını parçalamak için bir kitinaz görevi görerek beyaz hücrelerde hifal büyümeyi bloke eden Msp1 proteini salgılanmaktadır (Allonsius vd., 2019).

Yakın zamanda yapılan bir araştırmada, *Lactobacillus*'un salgıladığı 1-asetil-beta-karbolinin *C. albicans* hifal morfogenezini ve biyofilm oluşumunu inhibe ettiği tanımlanmıştır (MacAlpine vd., 2021). Bununla birlikte, beyaz hücrelerde hifal gelişimi bloke eden aynı koşullar, opak hücrelerde morfogenezini engellemez; bu, *C. albicans*'ın hem çevre hem de domainler arası etkileşimlere yanıt olarak gösterdiği geniş fenotipik esnekliği vurgulamaktadır (Liang vd., 2016).

Streptococcus agalactiae, vajinal mikroçevrede bulunan ve tekrarlayan vulvovajinal kandidiyazisi olan kişilerden yaygın olarak izole edilen başka bir bakteridir. *Lactobacillus*'a benzer şekilde, *S. agalactiae* bulunan bir ortamda yapılan çalışmada, *C. albicans* hifal morfogenezini inhibe ettiği görülmüştür. Bununla birlikte, farelerin *C. albicans* ve *S. agalactiae* ile birlikte aşılınması, tekrarlayan vulvovajinal kandidiyazisli bir fare modelinde, Th17 bağışıklık tepkisinin azalması nedeniyle fungus yükünü arttırmıştır; bu da patogenezi yönetmede fungus, bakteri ve konukçu arasındaki karmaşık bağlantıların olduğunu göstermektedir (Yu vd., 2018).

C. albicans'ın bir diğer önemli virülans özelliği, sağlık bakım ortamlarındaki kateterler gibi tıbbi cihazları kolonize eden, ilaca dirençli biyofilmler veya yüzeyle ilişkili topluluklar oluşturma yeteneğidir (Andes vd., 2004). *C. albicans* sıklıkla

Streptococcus spp., *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'tan oluşan polimikrobiyal biyofilmlerden izole edilmektedir (Dhamgaye vd., 2016; Lohse vd., 2017). Kateterler ve kalp pilleri gibi sağlık bakım cihazlarının yanı sıra bakterilerle kolonizasyonun diş boşlukları, periodontitis ve protez stomatiti ile ilişkili olduğu ağız boşluğunda da meydana gelmektedir (O'Donnell vd., 2015).

2.3.3. Bağırsak ve gastrointestinal sistemdeki *Candida*-bakteri etkileşimleri:

Bağırsak mikrobiyotası, insan vücudundaki en iyi araştırılan mikrobiyal toplulukları içermektedir. Bir bireyin bağırsak mikrobiyotası, dış ortamla sürekli temas ve içsel faktörlerin dalgalanması nedeniyle oldukça dinamik bir yapıya sahiptir. Beslenme, cinsiyet, yaş ve ilaçlar, yerleşik mikroorganizma topluluğunu şekillendirebilir. Bağırsakta oksijen seviyeleri, pH veya makro ve mikro besin maddelerinin bulunabilirliği gibi çevresel parametreler değişiklik göstermektedir ve bu da bakteri ve fungusların çeşitliliğini ve etkileşimlerini etkilemektedir (Donaldson ve Lee, 2016).

İnsan bağırsağındaki *C. albicans*; *E. coli*, *Salmonella enterica* ve *Enterococcus faecalis* dahil patojenik bakterilerle etkileşime girmektedir (Kumamoto vd., 2020). Önceki çalışmalarda *E. coli* biyofilmlerinin kültürü sırasında üretilen salgı ürünlerinin, *C. albicans* hifal morfogenezini ve hifle ilişkili anahtar genlerin ekspresyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (Bandara vd., 2013).

S. enterica serovar *typhimurium*, bir *Caenorhabditis elegans* enfeksiyon modelinde *C. albicans* hif oluşumunu inhibe etmiş ve inositol fosfataz sopB efektör molekülüne dayanan bir mekanizma aracılığıyla *C. albicans* hifini doğrudan öldürdüğü kanıtlanmıştır (Kim & Mylonakis, 2011).

Gram-pozitif bakteri *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans*'ın her ikisi de, ağız boşluğu ve gastrointestinal (GI) sistem gibi insan vücudunun aynı nişlerinin çoğunda ortak olarak bulunur. Ancak her ikisi de fırsatçı patojenlerdir ve sıklıkla polimikrobiyal enfeksiyonların ortak bileşenleri oldukları bulunmuştur. *E. faecalis*

ve *C. albicans* arasındaki etkileşim iyi bir şekilde incelenmiştir. Bu konuda yapılan ilk çalışmalar her iki organizmayla birlikte enfeksiyonun, bir *C. elegans* modelinde zayıflamış virülansa yol açtığını bulmuştur (Cruz vd., 2013). *E. faecalis*; *C. elegans*'ı *C. albicans* enfeksiyonundan koruyan, antifungal ve anti-filamantasyon aktivitesine sahip bir bakteriyosin olan EntV'yı salgılamaktadır (Graham vd., 2017). Sırasıyla para-Cresol ve cis-2-dodeknoik asit salgılayan fırsatçı patojenler *C. difficile* ve *Burkholderia cenocepacia* dahil olmak üzere birçok başka bakterinin de *C. albicans* morfogenezini yöneten çözünür faktörler ürettiği rapor edilmiştir (van Leeuwen vd., 2016).

Kolonda liflerin kullanılmasıyla gerçekleşen bakteriyel fermentasyonla kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar) üretilmektedir ve bu lipitler, sağlıklı bir mikrobiyotanın korunmasında rol oynamaktadır. SCFA'lar, *C. albicans*'ın in vitro büyümesini, hifal gelişimi ve biyofilm oluşumunu engellemektedir (Guinan vd., 2019). Sonuç olarak, *C. albicans* bağırsak enfeksiyonuna duyarlı antibakteriyel tedavi görmüş fareler, çekumda önemli ölçüde azalmış SCFA seviyeleri ve dışkılarda daha yüksek fungal yük sergileyerek, SCFA'ların *C. albicans* aşırı büyümesinin kontrol edilmesinde önemli olduğuna dair in vivo kanıtlar sağlamaktadır (Guinan ve diğerleri, 2019).

Kommensal bakteriler memeli bağırsağında *C. albicans* morfogenezinin etkinleştirilmesinde de rol oynamaktadır. *C. albicans*'ın antibiyotik uygulanan farelerin gastrointestinal kanalından geçişi, filamentasyonu pozitif olarak düzenleyen FLO8 transkripsiyon faktörünü kodlayan bir gendeki mutasyonlar nedeniyle hif oluşturmamayan düşük virülanlı suşların hızlı bir şekilde çoğalmasına yol açmıştır. Bu evrimleşmiş soylar, proinflamatuvar sitokinleri uyarmıştır ve diğer birçok bağırsak sakinine karşı geçici koruma sağlamıştır. Bununla birlikte, sağlam bir mikrobiyota mevcutsa, yalnızca virülan hif formunun devam etmesi, bakteriyel kommensallerin filamentli veya virülan formun desteklenmesinde kritik bir rol oynadığını düşündürmektedir (Tso ve diğerleri, 2018).

C. albicans bağırsakta bakterilerle ve mikrobiyotanın diğer üyeleriyle etkileşime girmektedir ve bu da onun çoğalma yeteneğini etkilemektedir. Son çalışmalarda, *C. albicans* ile bağırsak kommensali *Escherichia coli* (MG1655 suşu) arasındaki in vitro etkileşimleri araştırılmıştır. *E. coli*'nin, magnezyuma bağımlı bir şekilde fungusu doğrudan öldüren çözünür bir faktör salgıladığı bulunmuştur. *C. albicans-E. coli* ortak kültüründe magnezyumun tükenmesi, fungusun büyümeye devam etmesini sağlamıştır (Cabral vd., 2018).

C. albicans besin sınırlaması, nötr pH ve yüksek sıcaklık dahil olmak üzere konukçuyla ilgili çeşitli faktörlere yanıt olarak mayadan filamentli forma geçiş yapmaktadır (Shapiro vd., 2011). Filamentli hif morfolojisi, doku istilası ve yapışma için önemlidir, maya morfolojisi yayılma için zorunludur. Filamentli form aynı zamanda sitolitik peptid kandidalizin ve proteazların salgılanması dahil ek virülans faktörleriyle de ilişkilidir (Moyes vd, 2016; Witchley vd, 2019). Filamentli form ve standart "beyaz" yuvarlak oval maya morfolojisine ek olarak, *C. albicans* ayrıca farklı in vitro özellikler ve konukçuyla etkileşimler sergileyen birkaç uzun maya benzeri hücre tipine (opak, gri) dönüşebilmektedir. (Noble vd., 2017). *C. albicans*'ın benimsediği çeşitli morfolojik formların modüle edilmesi, onun hastalığa neden olma yeteneği üzerinde derin bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir.

Kommensal ve patojenik bakteriler, *C. albicans*'ın maya formundan hif formuna geçişinin düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır ve filamentasyonun hem inhibitörleri hem de arttırıcıları olarak tanımlanmışlardır.

2.3.4. Nazofaringeal bölgedeki *Candida*-bakteri etkileşimleri:

NP mikrobiyotasında yer alan mikroorganizmalar sinerjistik ve antagonistik mikrobiyal etkileşimler kurmaktadır. Yapılan bir araştırma, patojenik potansiyeli düşük olan kommensal mikroorganizmaların da bu ortamda iletişim kurduğunu ortaya çıkarmıştır. Örneğin *Corynebacterium* ve *Dolosigranulum*' un daha önce *S. aureus* bolluğunu azaltan faktörler salgıladığı düşünülmektedir. (Tan vd., 2007; Shak vd., 2013; Chien vd., 2013; Yan vd., 2013; Bittinger vd., 2014; Liu vd., 2015).

Pseudomonas aeruginosa; su ortamları, karasal ortamlar ve ökaryotik organizmalar da dahil olmak üzere çok çeşitli nişlerde kolonize olan gram negatif, aerobik bir çubuk şekilli bakteridir. İnsan mikrobiyotasının bir parçası olarak sıklıkla sağlıklı insanlardan izole edilen fırsatçı bir patojendir ve yaygın olarak *C. albicans* mayası ile polimikrobiyal enfeksiyonlarda bulunmaktadır. İnsan akciğerinde *P. aeruginosa* ve *C. albicans* arasında önemli bir bakteri-fungus etkileşimi meydana gelmektedir. Önceki çalışmalar, *P. aeruginosa*'nın, *C. albicans* filamentlerine fiziksel olarak bağlanabildiğini ve bunun da fungus hücresinin ölümüne yol açtığını göstermiştir (Hogan ve Kolter, 2002; Hogan vd., 2004). *P. aeruginosa*, in vitro olarak *C. albicans*'ın hiflerine doğrudan yapışır, biyofilmler oluşturur ve fenazın salgılamaktadır. Böylece hifin ölümüne yol açmaktadır. Bu durum sadece *C. albicans* hiflerini etkilemektedir, maya hücrelerini etkilememektedir. Yapılan çalışmalar hiflerin yok edilmesiyle bakterinin, biyofilm içinde *C. albicans*'tan besin elde etmesine olanak tanıdığını öne sürmektedir. Ayrıca, *C. albicans* tarafından üretilen farnesolün *P. aeruginosa*'nın quorum sensing (QS) molekülünü değiştirdiği iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Farnesolün eklenmesi, *Pseudomonas* quorum sensing sinyalinin (PQS) üretimini azaltmıştır bu durum piyosyanin salgısıyla ilişkilidir. *P. aeruginosa*'nın swarming hareketi farnesol tarafından değiştirilmekte ve bu da daha yüksek bir biyofilm biyokütlesinin oluşmasına yol açabilmektedir. *P. aeruginosa* tarafından antifungal aktiviteye sahip ilave bileşiklerin salgılanması karakterize edilmiştir (Hogan vd., 2002; Cugini vd., 2007; Brand vd., 2008). Fenazın bileşikler yüksek konsantrasyonlarda *C. albicans* büyümesini ve sub-inhibitör konsantrasyonlarda hifal morfogenezini inhibe etmektedir (Morales vd., 2013; Gibson vd., 2009). Fenazın üretimi, *C. albicans* ve *P. aeruginosa* arasındaki kimyasal etkileşimin merkezinde yer alır ve konukçu üzerinde sayısız etkiye neden olmaktadır. Büyüme sırasında *C. albicans*, fermantasyonun bir yan ürünü olarak etanol salgılar ve bu, *P. aeruginosa* tarafından piyosyanin gibi fenazın bileşiklerinin üretimini arttırmaktadır (Morales vd., 2013). Artan fenazın üretimi, mitokondriyal fonksiyondan ödün vererek fungal etanol salgısını arttırmaktadır (Lindsay vd., 2014). Fenazınlar ve etanol üretimi, her iki patojene karşı konukçu tepkisini etkiler; çünkü etanol, makrofajların *P. aeruginosa*'yı yok etme yeteneğini azaltırken fenazınlar epitelyal dokulara

doğrudan zarar vermektedir (Rada ve Leto, 2013). *P. aeruginosa* ve *C. albicans* arasındaki etkileşimler, konukçu bağışıklık hücrelerinin fagositozunda da önemlidir. Makrofajların *P. aeruginosa* ve *C. albicans* ile birlikte enfeksiyonu fungusun hayatta kalmasını, makrofajlardan kaçmasını azaltmaktadır ve tek başına *C. albicans* ile makrofaj enfeksiyonuna göre konukçu hücrelere yanıt olarak *C. albicans* filamentasyonunu azaltmaktadır (Salvatori vd., 2020).

C. albicans ve *P. aeruginosa*, her patojenin birbirlerine uyguladığı olumsuz baskılara uyum sağlayacak şekilde gelişmiştir. Örneğin, kistik fibroz hastalarının akciğerlerinden izole edilen klinik *C. albicans* izolatlarının, *P. aeruginosa*'nın filament baskılayıcı etkilerine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. *C. albicans* klinik izolatlarının genom dizilimi, yapısal olarak filamentöz suşların çoğunun, transkripsiyonel düzenleyici gen NRG1'de mutasyonlar barındırdığını ortaya çıkarmıştır; bu tür mutasyonlar filamentli fenotip için gerekli ve yeterlidir. Farklı kistik fibroz hastalarından alınan *Candida* izolatlarında 6 bağımsız nrg1 mutasyonu ortaya çıkmıştır (Kim vd., 2015).

NP disbiyozu, homeostazı bozarak kommensal mikrobiyotayı değiştirir ve bu disbiyoz, konukçuda inflamatuvar yanıtlar yaratarak mukozal ve sistemik bağışıklığı etkiler. Yaşlı popülasyonları pnömoni ve daha invazif hastalıklara neden olabilen *Streptococcus pneumonia* gibi patojenlere karşı güçsüzdür. Yaşlıların üst solunum yollarının doğrudan kolaylıkla kolonize olabilmektedir. Yapılan çalışmada, yaşlı farelerin *S. pneumoniae*'yi genç fareler kadar başarılı bir şekilde yok edemediği, *S. pneumoniae* kolonizasyonu sırasında NP mikrobiyota değişikliklerin olduğunu rapor edilmiştir. Kolonizasyon gerçekleştiğinde disbiyoz meydana gelmektedir. Disbiyoz sonucunda bakteriyemi, sepsis, mastoidit, septik artrit ve endokardit meydana gelebilmektedir (Kobayashi, 2000; Murphy ve Paraweswaran, 2009; Flamaing vd., 2010; Cremers vd., 2014; Zapata ve Quagliarello, 2015; Thevaranjan vd., 2016).

2.4. Endofungal Birliktelikler

Yukarı ki bölümde örneklerle açıklanan bakteriyel-fungal etkileşimler genellikle bakteriler ve fungusların birbirleriyle fiziksel olarak ve metabolitler salgılayarak etkileşimler kurduğunu göstermektedir. Bakteriyel-fungal etkileşimler bakteri ve fungus üzerindeki etkileri açısından son derece değişkenlik göstermektedir. Bakteriyel-fungal etkileşimler içerisinde en ilgi çekici olan ve bakterinin fungal hif içerisinde endofungal olarak yaşadığı simbiyotik yaşam tarzıdır. Fungal hücrelerin içinde yaşayan bakteriler endofungal bakteriler olarak isimlendirilmiştir. Endofungal bakteriler fungal sitozolde, misellerde, sporlarda ve fungal vakuolde yaşayabilmektedir. (Partida-Martinez vd., 2005; Partida-Martinez vd., 2007; Partida-Martinez vd., 2008; Lackner vd., 2009a; Lackner vd., 2009b; Lackner ve Hertweck, 2011; Lackner vd., 2011; Birol ve Günyar, 2021; Günyar vd., 2022; Liu vd., 2024).

Misellerde ve sporlarda simbiyotik olarak yaşayan endofungal bakteriler, 1970' lerde ilk olarak Bakteri Benzeri Organizmalar (BLO'lar) olarak tanımlanmıştır (Mosse, 1970). Endofungal bakterilerin dağılımı fungus alemindeki tüm önemli sınıfların üyelerini içermesine rağmen, mikorizal funguslar endofungal bakterileri barındırdığı bilinen en yaygın gruptur. İlk kez *Gigaspora margarita* arbüsküler mikorizal fungusunda bulunan endofungal bakteri *Candidatus glomeribacter gigasporum* olarak tanımlanmıştır (Bianciotto vd., 2003). Endofungal bakteriler; ökaryotik hücreler olan fungusların sporlarında, sitoplazmasında, membrana bağlı vakuollerinin içinde yaşayarak hücre yapılarını koruyup hayatta kalmaya devam ederler ve bu şekilde kendilerini gelecek nesillere aktarabilmektedirler (Siavoshi vd., 2019; Birol ve Günyar, 2021; Günyar vd., 2022).

Fungus hücrelerinin içinde endofungal olarak yaşayan bakteriler uzun süredir bilinmektedir ve özellikle çevresel örneklerden izole edilen funguslar içerisinde yaşayan endofungal bakterilerin çeşitliliğine dair ve endofungal bakterilerin ürettiği sekonder metabolitler üzerine yapılmış çok sayıda çalışma vardır (Partida-Martinez vd., 2005; Partida-Martinez vd., 2007a; Partida-Martinez vd., 2007b; Partida-

Martinez vd., 2007c; Partida-Martinez ve Hertweck, 2007; Partida-Martinez vd., 2008; Lackner vd., 2009a; Lackner vd., 2009b; Lackner vd., 2011; Birol ve Günyar, 2021; Günyar vd., 2022; Liu vd., 2024). Ancak klinik örneklerden izole edilen funguslar ve barındırdıkları endofungal bakteriler ile ilgili çok sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.

Filamentli *Rhizopus* türlerinin bazı suşları, fermente gıda üretiminde kullanılırken, bazılarıda bitki patojenleri ve fırsatçı insan patojenleri olarak bilinmektedir. Bazı *Rhizopus* türlerinin toksin üreticisi endofungal bakterileri barındırdığına dair raporlar bulunmaktadır ve endofungal bakteri-*Rhizopus* birlikteliğinin gıda güvenliği ve insan sağlığı açısından önemli olduğu rapor edilmiştir (Lackner vd., 2011). Bazı endofungal bakteriler ökaryotik konukçu hücrelerdeki β -tubulin'e bağlanarak mitozu bloke eden rhizoxin toksinini salgılamaktadır. Rhizoxin toksininin insan kanser hücre dizileri dahil bir çok ökaryotik hücrede güçlü antimitotik aktivitesi nedeniyle, potansiyel bir antitümör ajan olarak önemli derecede ilgi görmektedir (Partida-Martinez vd., 2005; Partida-Martinez vd., 2007a; Partida-Martinez vd., 2007b; Partida-Martinez vd., 2007c; Partida-Martinez ve Hertweck, 2007; Partida-Martinez vd., 2008; Lackner vd., 2009a; Lackner vd., 2009b; Lackner ve Hertweck, 2011; Lackner vd., 2011; Richter vd., 2024).

R. microsporus fungusundan izole edilen endofungal bakteri rhizoxin üretme yeteneğine sahip olduğu için *Burkholderia rhizoxinica* olarak isimlendirilmiştir. *B. rhizoxinica*'nın rhizoxin üretme kapasitesine dair yapılan çalışmalarda rhizoxinin minör bir bileşen olduğu ve 20'den fazla anti-mitotik türevi olduğu gösterilmiştir. Anti-mitotik özelliğe sahip diğer bileşenler rhizoxinle karşılaştırıldığında daha yüksek sitotoksik aktivite sergiledikleri rapor edilmiştir ve günümüze kadar bilinen en güçlü anti-mitotik ajanlar arasında olduğu belirtilmiştir (Partida-Martinez vd., 2005; Partida-Martinez vd., 2007; Schmitt vd., 2008; Lackner vd., 2009a; Lackner vd., 2011).

Partida-Martinez ve arkadaşlarının endofungal bakteriler tarafından üretilen toksinlere dair yaptığı başka bir çalışma yapmıştır. Rhizonin A ve rhizonin B toksinlerinin Mozambik yer fıstığından izole edilen *R. microsporus* içinde endofungal olarak yaşayan *Burkholderia endofungorum* tarafından salgılandığını rapor etmiştir (Partida-Martinez vd., 2007).

Ekmekten izole edilen *R. microsporus* Rh-2 ve *Rhizopus* sp. F-1360 suşlarının rhizoxin üreticisi olduğu ve yer fıstığından izole edilen *R. microsporus* MRC 303'ün güçlü bir hepatotoksik rhizonin üreticisi olduğu rapor edilmiştir (Jennessen vd., 2005).

Lackner ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 20 farklı *Rhizopus* türünden toplam 8 fungal suşun endofungal bakteri içerdiği ve rhizoxin üretebilme kapasitesine sahip olduğu saptanmıştır (Lackner vd., 2009b).

Oshima ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, toprak kaynaklı *Mortierella elongata* FMR23-6IB1 'da endofungal olarak yaşayan bakteri izole edilmiştir. Dizi analizi sonucunda çalışmada izole edilen endofungal bakterinin *Burkholderiaceae* ailesinde belirgin bir grup oluşturduğu görülmüştür. Bu türün *Mycoavidus cysteinexigens* gen. nov., sp. nov. olduğu rapor edilmiştir (Oshima vd., 2016).

Schulz-Bohm ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Carex arenaria* bitkisinin rizosferinden izole edilen, saprotrofik fungus *Mucor hiemalis* ile ilişkili endofungal bakteri topluluğu ilk kez tanımlanmıştır. Çalışmada endofungal bakterilerin *Bradyrhizobium oligotrophicum*, *Bradyrhizobium liaoningense*, *Brevundimonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* subsp. *sakuensis*, *Rhodonobacter* sp., olduğu belirlenmiştir (Schulz-Bohm vd., 2017).

Birol ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada piyasada satışa sunulan gıda örneklerinden izole ettikleri 51 *Rhizopus* suşundan 14'ünde endofungal bakterileri izole etmişlerdir. 14 *Rhizopus* türünün ve içinde barındırdığı endofungal bakterinin tanısı sonucunda tüm fungusların *Rhizopus oryzae*, bakterilerin 11 *Serratia*

marcescens, 1 *Pseudomonas fluorescens*, 2 *Klebsiella pneumoniae* olduğu belirlenmiştir (Bırol ve Gunyar, 2021).

Günyar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 237 farklı tarım alanından alınan toprak örneklerinden izole edilen Zygomycetes grubu funguslarda endofungal bakterilerin varlığı araştırılmıştır. 237 Zygomycetes izolatu elde edilmiştir. Tüm fungal izolatlarda endofungal bakterilerin varlığı, ribozomal RNA'ya yönelik oligonükleotid prob kullanılarak gerçekleştirilen floresan in situ hibridizasyon (FISH) analizi ile araştırılmıştır. FISH analizi sonucunda fungal hiflerde endofungal bakteri hücreleri gözlenmiştir ve ardından endofungal bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Endofungal bakteri izolasyonu gerçekleştirilen 20 Zygomycete izolatu fenotipik ve genotipik olarak tanımlanmıştır. Fungusun total DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonunun ardından elde edilen dizilerin sekans analizi ile endofungal bakteriler tanımlanmıştır. Çalışmada *Alcaligenes faecalis* (11), *Bacillus circulans* (1), *Bacillus thuringiensis* (3), *Bacillus cereus* (1), *Klebsiella pneumoniae* (2), *Leucobacter aridiculis* (1) ve *Serratia marcescens* (1) endofungal bakteri türleri olarak tanımlanmıştır (Günyar vd., 2022).

Cheng ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada *Fusarium oxysporum* KB-3'ün, hiflerinde endohifal bakterilerin varlığı 16S rDNA gen bölgesinin PCR amplifikasyonu ve SYTO-9 floresan nükleik asit boyama yöntemi ile gösterilmiştir. *Fusarium oxysporum* KB-3'ün içerisinde yaşayan endofungal bakterinin *Klebsiella aerogenes* KE-1 suşu olduğu belirlenmiştir. Endohifal bakteri, wild type *Fusarium oxysporum* KB-3 (KB-3-) suşundan başarıyla izole edilmiş ve GFP ile işaretlenmiş *Klebsiella aerogenes* KE-1 suşu, KB-3- suşuna (KB-3⁺) da aktarılmıştır. KE-1, KB-3, KB-3⁻ ve KB-3⁺ suşlarının kültür sıvılarında indol-3-asetik asit (IAA) üretimi HPLC ile incelenmiştir. En yüksek IAA konsantrasyonları sırasıyla 76.9, 31.4, 9.6 ve 19.4 µg/ml olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, üç fungal kültür sıvısı domatesin kök ve gövde büyümesini teşvik etme yeteneği göstermiştir. Sonuçlar, mikorizal *Fusarium* suşu KB-3'ün bitki büyümesini destekleme yeteneğinin, içinde

barındırdığı endofungal bakterisi *Klebsiella aerogenes* KE-1'in belirli miktar IAA üretmesinden dolayı arttığını göstermiştir (Cheng vd., 2022).

Mucorales (Mucoromycotina) içindeki termotolerant funguslar arasında Burkholderiaceae ile ilişkili endobakteriler (BRE) nadiren bulunmaktadır ve bilinen konukçu aralığı *Rhizopus* spp. ile sınırlıdır. BRE'nin dağılımı, son zamanda *Mortierellaceae* spp. (Mortierellomycotina) gibi diğer fungus gruplarında genişlemiştir. Takashima ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Japonya'nın Ogasawara (Bonin) Adaları'ndan Haha-jima Adası'ndan toplanan örnekten termotolerant bir mucoralean fungus izole edilmiştir. Fungus morfolojik, filogenetik ve fizyolojik olarak karakterize edilmiş ve yeni bir tür *Saksenaea boninensis* sp. nov. olarak önerilmiştir. Fungus taksonomisine ek olarak, bu izolattan elde edilen total DNA'da 16S rRNA geninin PCR ile amplifikasyonu, floresan mikroskop gözlemleri ve endofungal bakterinin saf kültürde izole edilmesiyle BRE'nin varlığı tespit edilmiştir. BRE'nin 16S rRNA geninin filogenetik analizi, bilinen tüm BRE'lerden farklı olduğunu göstermiştir. 16S rRNA geninin filogenetik analizi, endofungal bakterinin filogenetik olarak Burkholderiaceae familyası ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Ancak endofungal bakterinin filogenetik konumu ne "*Glomeribacter-Mycoavidus*" ne de *Mycetohabitans* spp. ile kümelenmemiştir. Bu sonuç, *S. boninensis* izolatlarında bulunan endofungal bakterinin yeni BRE soyu (bundan sonra "SakBRE" olarak adlandırılacaktır) olduğunu göstermektedir. *Saksenaea* cinsinde kültüre edilebilir bir BRE soyunun keşfi, mucorales grubu fungus-BRE ilişkilerinin evrimsel kökenine yeni bir anlayış katacak ve mukormikozis oluşturan termotolerant mucoralean funguslarıyla ilişkili endofungal bakterilere daha fazla dikkat edilmesi gerektiğinin altını çizecektir (Takashima vd., 2023).

Zhang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Rhizoctonia solani*'den izole edilen *Enterobacter* sp. Crenshaw (En-Cren) karakterize edilmiştir ve bakterinin fungus ile ilişkili fenotipik özellikler açısından genetik potansiyeli araştırılmıştır. Genel olarak, En-Cren genomunun boyutu cinsin üyeleri için tipiktir ve serbest yaşamaya uygun bir büyüme kapasitesine sahiptir. Genom boyutu 4.6 MB'dir ve

plazmid tespit edilmemiştir. Filogenetik olarak yakın akrabaları olan diğer *Enterobacter* spp. ile karşılaştırıldığında, onlardan farklı genler bulundurduğu tespit edilmiştir. Bakteride Tip VI sekresyon sistemi ve siyanat asimilasyon genleri tespit edilmiştir, ancak bazı yaygın ağır metale karşı direnç genleri yoktur. En-Cren, indol-3-asetik asit (IAA) ve fenilasetatik asit (PAA) biyosentezi için gerekli olan anahtar genleri içermektedir ve in vitro ortamda IAA ve PAA üretmektedir. Bu durum da fungal patojenin ekolojisini veya patojenitesini in vivo etkileyebilmektedir. En-Cren'in *R. solani*'nin hifleri boyunca ve kültüre edildiğinde diğer basidiyomisetler ve askomisetler üzerinde hareket ettiği gözlemlenmiştir. Bakteriyel flagellum hif hareketi için esastır, diğer yollar ve genler de buna dahil olabilmektedir. Çalışmada gerçekleştirilen *Enterobacter* sp. Crenshaw'ın karşılaştırmalı genom analizi, bu endohifal bakterinin rizosferdeki ekolojisi ve evrimi hakkında daha fazla bilgi sağlamak için kaynaklar sunmaktadır. İndol-3-asetik asit ve fenilasetatik asit üretme yeteneği, bitki-patojen etkileşimleri sırasında fitohormonların etkisini incelemek için yeni araştırma konularını sunmaktadır. Bakterinin çeşitli fungus gruplarından bazılarının büyümelerini inhibe etme davranışı, henüz keşfedilmemiş bakteriyel-fungal sinyalleşme ve etkileşimlerin var olabileceğini ortaya çıkarmıştır (Zhang vd., 2024).

Liu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *R. arrhizus*'un farklı suşlarıyla ilişkili iki ayrı endofungal bakteri (EFB) canlı/ölü boyama, in situ floresan hibridizasyon, transmisyon elektron mikroskobu ve 16S rDNA dizilemesi kullanılarak tanımlanmıştır. *R. arrhizus* XY03792 ve XY03829 fungal suşlarından saflaştırılan endofungal bakteriler sırasıyla *Pandoraea sputorum* EFB03792 ve *Mycetohabitans endofungorum* EFB03829'dur. Bu çalışma, *Pandoraea*'nın bir endofungal bakteri olarak tanımlandığı ilk çalışmadır. Serbest yaşayan akrabalarına kıyasla, *P. sputorum* EFB03792 virülans faktörü ile ilgili 28 spesifik gen, altı spesifik CE10 aile genleri ve tip III salgın sistemi (T3SS) ile ilişkili 74 gen barındırmaktadır ve bu sayede yayılma ve kolonizasyonundaki kritik rolü vurgulanmıştır. Çalışmanın sonuçları *R. arrhizus*'un , endofungal *M. endofungorum* için yeni bir konukçu olabileceğini göstermektedir (Liu vd., 2024).

2.5. İnsan Vücudundaki Endofungal Bakteriler

Endofungal bakterilere dair çalışmalar bir önceki bölümde açıklandığı gibi genellikle çevresel örneklerden rapor edilmiştir. Klinik örneklerle yapılan çalışmalar sınırlıdır.

Partida-Martinez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 8 klinik *Rhizopus microsporus* suşunun virülansının endofungal bakterilerle ilişkili olup olmadığını belirlemek için bu klinik izolatlarda endofungal bakterilerin varlığını araştırmışlardır (Partida-Martinez vd., 2008).

İbrahim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, klinik *Rhizopus oryzae* izolatlarında endofungal bakterilerin varlığı ve zigomikozise katkısı olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla PCR ile 28 klinik *Zygomycetes* izolatının 15'inde (%54) endofungal bakteriler tespit edilmiştir ve endofungal bakteri suşlarının %33'ü *Burkholderia* 16S rDNA'sı ile %87'den fazla benzerlik göstermiştir. Endofungal bakteri barındıran funguslardan alınan mycelial ekstraktlarda rhizoxin varlığı yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) analizi ile doğrulanmıştır. (İbrahim vd., 2008).

Dolatabadi ve arkadaşları 8 klinik, 20 gıda ve 4 çevresel ve 1 izolasyon kaynağı bilinmeyen örnekten izole ettikleri 33 *Rhizopus microsporus* ve 21 klinik, 5 gıda, 5 çevresel kaynaklardan izole ettikleri 31 *Rhizopus arrhizus* suşu olmak üzere toplamda 64 *Rhizopus* spp. 'de endofungal bakterilerin varlığını araştırmışlardır. 3 gıda, 1 klinik , 1 izolasyon kaynağı bilinmeyen, 2 çevresel kaynaklı örnekten izole edilen 7 *Rhizopus microsporus* suşunda endofungal bakteriler tespit edilmiştir. Hiçbir *Rhizopus arrhizus* suşunda endofungal bakteri tespit edilmemiştir (Dolatabadi vd., 2016).

Yang ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptığı bir çalışmada ciddi derecede bağışıklık sistemi baskılanmış bir hastada, *R. microsporus* fungusunun neden olduğu multifokal pnömoni ile ilişkili *M. rhizoxinica* bakteriyemisini rapor etmişlerdir (Yang vd., 2022). Çalışmada hastanın kanından izole edilen endofungal

bakteri *M. rhizoxinica*'yı, hastanın solunum örneğinden izole edilen *R. microsporus* küfü içinde bulunan bakterilerle ilişkili olduğunu gösteren net kanıtlar sunulmaktadır. Antibiyotiğe başlanmadan önce kan kültüründe izole edilen bakteriler, test edilen antibiyotiklere karşı duyarlıdır ve tedaviden sonra hızla yok olmuştur. Bununla birlikte, antibiyotiklerin fungus sitoplazması içindeki bakterilere karşı etki gösterip göstermediği veya etkinin sadece fungusların dışındaki bakteriler için mi olduğu açık değildir. Bakterilerin büyük olasılıkla in vivo olarak fungusun içinde bulunduğunu ve yalnızca örnek izole edildikten sonra fungus parçalandığında veya degrade olduğunda inkübasyon sırasında kan kültürü şişesinde büyüdüğü hipotez edilmiştir. Kan kültürünün *Mucorales* türleri için uygun olmaması, bu küflerin genellikle kan kültürü işlemi sırasında öldüğünü göstermektedir. Klinik belirtiler nedeniyle, bakterilerin sepsise katkıda bulunmadığı bunun yerine hastanın CAR T-hücresi tedavisine bağlı bağışıklığın baskılanması sırasında ortaya çıkan invaziv fungal enfeksiyon için bir sinyal görevi gördüğü düşünülmektedir. Çalışmada analize alınan hasta hızla dekompanse olmuştur ve fungus tespit edilemeden ve antifungal tedavi başlatılmadan hayatını kaybetmiştir. Enfekte dokularda enfarktüs ve nekroz mukormikozun ayırt edici özellikleridir. Bu vakada pulmoner bulgulara ve hemorajik beyin enfarktüsüne dayanan olası tanı olan dissemine mukormikozis, %90'ın üzerinde mortalite oranıyla birlikte hızla ilerleyen bir enfeksiyondur. Bu hastanın, derin immün baskılanma nedeniyle yaygın mukormikoz riski altında olduğu belirtilmiştir. Mukormikozun erken teşhisi ve hızlı tedavisi, klinik sonuçların iyileştirilmesinde en temel anahtardır. Bu vakada altta yatan bulaşıcı süreç yaygın mukormikoz gibi görünmektedir, ancak bu raporda olası tanıyı doğrulamak için otopsi incelemesi bulunmamaktadır. Sonuç olarak, klinik örnekten endofungal bakteri *M. rhizoxinica*'nın izolasyonunun invaziv *Rhizopus* enfeksiyonunu işaret edebileceği tespit edilmiştir. Çoğu klinik laboratuvarında kullanılan tanımlama yöntemleri sınırlı olduğundan, endofungal bakteriler tanımlanamayabilmektedir ve tanımlanması için sekans analizi yapılması gerekmektedir (Yang vd., 2022).

Bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerdeki fungal enfeksiyonlar önemli bir klinik sorundur. *Mucorales* grubundaki fungus sporları çevrede her yerde

bulunabilmektedirler. Bu grubun üyeleri bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde akut invaziv enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Bunu nasıl başardıkları ve virülans mekanizmalarının edinilmesinin altında yatan evrimsel güçler yeterince anlaşılmamıştır. Itabangi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *R. microsporus* klinik izolatının hem zebra balığında hem de farelerde virülans için gerekli olan endofungal *Ralstonia pickettii* barındırdığını ve bu endofungal birlikteliğin toprakta yaşayan bir amip türü olan *Dictyostelium discoideum*'un büyümesini güçlü bir şekilde baskılayan faktörlerin salgılanmasını ve diğer mikroorganizmaları öldürme yeteneği sergilediğini rapor etmişlerdir. Amipler hem bakterilerin hem de fungusların doğal çevresel yırtıcıları olduğundan, bu üçlü krallık etkileşiminin endofungal birlikteliğin kurulmasına ve anti-fagosit aktivitesinin kazanılmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu aktivitenin, fungus sporlarını fagositozdan ve insan makrofajları tarafından yok edilmekten koruduğu gösterilmiştir. Endofungal bakterinin uzaklaştırılmasıyla fungus sporlarının avirulent hale geldiği rapor edilmiştir. Bu bulgular, hayvanlardaki *R. microsporus* patogenezinde bakteriyel bir endofungal bakterinin yeni bir rolünü tanımlamaktadır (Itabangi vd., 2022).

Tansarli ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada endofungal bakteri *Mycetohabitans rhizoxinica*'nın (eski adıyla *Burkholderia rhizoxinica*) ve konukçu fungusu moleküler yöntemler kullanılarak aynı doku örneklerinden tanımlamışlardır ve histopatolojiyle kanıtlanmış rinocerebral mukormikozun ilk iki vakası sunulmuştur (Tansarli vd., 2023).

İlk vaka; ani görme kaybı, ağrı ve sol gözde proptoz şikayetiyle başvuran, son dönem böbrek hastalığı bulunan 56 yaşında bir erkek hastadır. Hastanın baş vücut bilgisayarlı tomografi anjiyografisinde (BTA) spesifik olmayan bulgular nedeniyle inme değerlendirmesi negatiftir. Dört gün sonra hastada subaraknoid kanamaya bağlı olarak akut sağ hemipleji gelişmiştir. Tekrarlanan BTA'sında supraklinoid sol internal karotid arterden (ICA) kaynaklanan ve rüptüre mikotik anevrizma olduğu tahmin edilen 5 mm'lik yeni bir anevrizma ortaya çıkmıştır. Sfenoid dokudan alınan kültürde, 16S rRNA geninin V1-V2 hiperdeğişken

bölgesinin PCR amplifikasyonu ve Sanger dizilimi ile *M. rhizoxinica* olarak tanımlanan Gram-negatif bir organizma ve Mucormycete grubuna özgü nested PCR'la *R. microsporus* tespit edilmiştir. Hastaya sol supraklinoid İKA embolizasyonu uygulanarak İV posakonazol tedavisi uygulanmıştır ama hasta maalesef hayatını kaybetmiştir.

Çalışmadaki ikinci vaka, sinüs enfeksiyonu öyküsü olan ve beyin dura tabanına uzanan yeni bir sinüzit gelişen 52 yaşında erkek hastadır. Hasta okülomotor felç, baş ağrısı ve görme kaybı semptomlarıyla kliniğe başvurmuştur. Beyin MR'ı ameliyatı gerektiren bir lezyonu olduğunu ortaya çıkarmıştır. Sfenoid mukozanın biyopsi bulguları bilinmemektedir ve bakteri kültüründe koagülaz negatif stafilokoklar ve *Cutibacterium* spp. tespit edilmiştir. Hasta amoksisilin/klavulanat ile tedavi edilmiştir ve semptomları düzelmiştir. Fakat bir ay sonra kötüleşen baş ağrıları oluşmuştur ve yeni bir ameliyat gerçekleştirilmiştir. Biyopsi yapılan dokunun histopatolojik incelemesinde mukormikoz ile uyumlu, geniş ve şerit benzeri aseptat hifler tespit edilmiştir. Hastaya 6 hafta boyunca doksisisiklin ve yüksek doz posakonazol tedavisi verilmiştir. Fakat beyin lezyonları ve semptomları geri geldiğini için hastaya izavukonazole verilmiştir. İlave 4 aylık tedavi sonrasında hastanın MR'ı stabil ve hafif baş ağrısı semptomları ortaya çıkmıştır. PCR çalışmalarıyla, hem sinüs hem de beyin zarından (dura) alınan numunelerde *M. rhizoxinica* tespit edilmiştir. Her iki örnekte de *R. microsporus*'un tespit edilmesi için spesifik PCR gerçekleştirilmiştir. Klinik örneklerde *M. rhizoxinica*'yı tespit eden önceki çalışmalar ayrıntılı klinik bilgiler içermemektedir ve bakterinin kontaminasyondan kaynaklı olmadığı ayırt edilememektedir. Yapılan bu çalışmada iki vakada da endofungal bakteri varlığında fungusun patojenesinin arttığına dair net bir kanıt gösterilememiştir. Ancak mukormikoz için belirlenmiş bir risk faktörünün yokluğunda her iki hastada da ciddi enfeksiyon gelişmesi bu şüpheyi arttırmaktadır. Endofungal bakterileri taşıyan fungal suşların farklı bir doku tropizmine sahip olup olmadığını veya bağışıklık sistemi zayıflığı olmayan veya sınırlı olan hastalarda daha sık ortaya çıkıp çıkmadığını belirlemek için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Bulgular, geniş aralıklı bakteriyel PCR'ın belirli

mukormikoz şüphesi vakalarında ikincil bir teşhis aracı olarak hizmet etme potansiyelini vurgulamaktadır (Tansarli vd., 2023).

2.6. *Candida* spp. Ve Endofungal Bakteriler

Endofungal birliktelikte hem fungal hem bakteriyel partner biyolojik olarak farklı taksonomik çeşitliliğe sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Candida* türleri içerisinde endofungal bakterilerin varlığı saptanmıştır (Saniee vd, 2013a; Saniee vd, 2013b; Siavoshi vd, 2013; Matamala-Valdés vd, 2018; Siavoshi vd., 2019; Sánchez-Alonzo vd, 2020; Heydari vd., 2020).

2.6.1. *Helicobacter pylori*:

Helicobacter pylori (*H. pylori*), insan midesinin mukozasında kolonize olan bir gram-negatif , mikroaerofilik, spiral, kıvrımlı şekle sahip bakteridir. Bu şekli onun mukus tabakasında hareket etmesine ve mide epitel hücrelerine ulaşmasına yardımcı olmaktadır. *H. pylori*'nin, dünya çapında kronik gastrit, peptik ülser, mide adenokarsinomu ve MALT lenfoma gibi çeşitli gastroduodenal hastalıkların etiolojisinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. *H. pylori*'nin başarılı bir patojen olmasının en önemli sebeplerinden biri, sahip olduğu çeşitli virülans mekanizmalarıdır. Bu mekanizmalar, bakterinin konak savunma mekanizmalarından kaçmasına, mukozada kolonize olmasına ve hasara yol açmasına yardımcı olmaktadır (Kusters vd., 2006; Salama vd., 2013; Backerts ve Blaser, 2016).

Mide lümeni asidik bir pH'ya sahiptir. *H. pylori* mide lümeninde çok kısa sürede yaşayabilmektedir. En kısa sürede yaşayabileceği mide mukus tabakasına ulaşması gerekmektedir. *H. pylori* hızlı hareketi ve üreaz enzimi sayesinde mucus tabakasına ulaşmaktadır. Bakteri epitel hücrelerden salgılanan üreyi, üreaz enzimi aracılığıyla parçalayarak amonyak oluşturmaktadır ve bu amonyak sayesinde içerisinde yaşayabileceği pH aralığını oluşturmaktadır (Kusters vd., 2006). VacA proteini, *H. pylori*'yi bakterisidal etkilerden koruyan bir proteindir. *H. pylori* suşlarının yaklaşık % 50'sinde bulunmaktadır. Bu proteinin mide patojenezinde

önemli bir virulans faktörü olabileceği yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Figueiredo vd., 2005; Kusters vd., 2006).

2.6.2. *H. pylori*'nin virulans özellikleri:

H. pylori kamçısı sayesinde düşük pH'lı mide koşullarından mide epitel hücrelerine hareket edebilmektedir. Bakteri kamçısı sayesinde mukus tabakasından geçebilmektedir. Midedeki asidik ortamdan kaçamayan hareketsiz bakteriler midede kolonize olamaz (Har vd., 2003).

H. pylori, spiral şekli ve kamçısı sayesinde midenin viskoz mukus tabakasında hareket edebilir. Kamçı bakterinin sıvı ortamda yüzmesine ve katı yüzeylerde kaymasına olanak tanımaktadır. *H. pylori*, kemotaksis adı verilen bir mekanizma ile kimyasal sinyalleri algılar ve bu sinyallere doğru hareket etmektedir. Bu özellik, bakterinin mide mukozasında besin maddelerini bulmasına ve uygun kolonizasyon bölgelerine ulaşmasına yardımcı olmaktadır. *H. pylori*, üreaz enzimi üreterek mide asidini nötralize ederken, kamçı sayesinde mukus tabakasında hareket eder ve epitel hücrelere ulaşmaktadır. Kamçı bakterinin mukus tabakasında ileri doğru hareket etmesini sağlamaktadır. Bu hareketlilik, bakterinin mide mukozasında daha derin katmanlara nüfuz etmesine ve daha iyi bir şekilde kolonize olmasına olanak tanımaktadır. *H. pylori* tip III ve tip IV salgı sistemlerini kullanmaktadır. Bu salgı sistemleri, kamçıların montajı ve hareketliliği için gerekli proteinleri sağlamaktadır. Tip III salgı sistemi, kamçının bazal gövdesinin montajında rol oynar ve kamçının hücre zarından geçmesini sağlar. Tip IV salgı sistemi ise, kamçının ucundaki filamentin montajını ve uzamasını düzenlemektedir. Kamçı sayesinde bakteri konak savunma mekanizmalarından kaçmasına ve bağışıklık sisteminden korunmasına yardımcı olmaktadır (Lertsethtakarn vd., 2011).

Üreaz, *H. pylori*'nin mide mukozasında kolonize olmasında kritik bir rol oynamaktadır. Bakteri, mukus tabakasında üreyi üreaz enzimi ile hidrolize ederek lokal bir pH artışı sağlamaktadır ve bu da bakterinin mukus tabakasında hareket

etmesine ve epitel hücrelere ulaşmasına olanak tanımaktadır. Üreaz negatif mutantlar, mide mukozasında kolonize olma yeteneklerini büyük ölçüde kaybetmektedirler, bu da üreazın kolonizasyon için ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Üreaz, *H. pylori*'nin konak savunma mekanizmalarından kaçmasına yardımcı olmaktadır. Amonyak, bağışıklık hücreleri üzerinde toksik etkiler yaparak lokal inflamasyonu arttırmaktadır ve bağışıklık yanıtını modüle etmektedir. Üreaz sayesinde *H. pylori*'nin fagositik hücreler tarafından tanınmasını ve yok edilmesini zorlaştırmaktadır. *H. pylori*'nin üreaz üretimi, mide mukozasında kronik iltihaplanma ve hücresel hasara yol açmaktadır böylece bu durum kronik gastrit, peptik ülser ve uzun vadede mide kanseri riskini arttırmaktadır. Üreaz aktivitesi, mide epitel hücrelerinde apoptozu tetikleyerek hücresel döngü bozukluklarına ve malign transformasyonlara katkıda bulunabilmektedir (Olivera-Severo vd., 2017).

VacA (vacuolating cytotoxin A) *H. pylori*'nin virulansında önemli bir yer tutmaktadır. VacA, *H. pylori*'nin konukçu hücrelerine zarar vermesini ve bağışıklık sisteminden kaçmasını sağlayan önemli bir toksindir. VacA, hücrelerde vakuolizasyon adı verilen büyük veziküllerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu vakuoller, hücre içi transport sistemlerini ve hücresel homeostazı engellemektedir. VacA, mitokondriye bağlanarak apoptotik yolları tetikleyebilmektedir ve hücre ölümüne yol açabilmektedir. VacA, endozomal-lysosomal yolları bozmaktadır ve hücredeki besinlerin ve organellerin normal işleyişini engellemektedir. VacA'nın konukçunun bağışıklık hücrelerinin fonksiyonlarına karşıda olumsuz etkisi bulunmaktadır. Bu toksin, T hücrelerinin proliferasyonunu ve aktivasyonunu inhibe ederek, *H. pylori*'nin bağışıklık sisteminden kaçmasını kolaylaştırmaktadır. VacA'nın neden olduğu hücresel hasar ve inflamasyon, kronik gastrite ve peptik ülserlere sebep olmaktadır. Kronik inflamasyon ve hücre hasarı, mide mukozasında metaplazi ve displaziye neden olabilmektedir böylece gastrik kanser riskini arttırmaktadır. Konak hücrelerinin bağışıklık yanıtını zayıflatarak *H. pylori*'nin mide mukozasında uzun süreli hayatta kalmasını desteklemektedir. Bu, enfeksiyonun kronikleşmesine ve daha ciddi hastalıklara yol açmasına neden olmaktadır. VacA'nın immünmodülatör etkileri, bakterinin konak savunma

mekanizmalarından kaçışını ve enfeksiyonun kalıcı hale gelmesini sağlamaktadır (Garruti vd., 2021).

H. pylori'nin dış zarı, lipopolisakkaritler (LPS) içermektedir. LPS, bağışıklık sistemini etkileyen ve inflamatuvar yanıtları tetikleyen bir virülans faktörüdür. *H. pylori*'nin LPS'i, diğer bakteriyel patojenlerin LPS'lerinden farklıdır. *H. pylori*'nin LPS'i, bağışıklık hücrelerinde Toll-like reseptörler (TLR) üzerinden farklı yanıtları tetikleyebilmektedir. Örneğin, bazı çalışmalar *H. pylori* LPS'inin TLR2 aracılığıyla nükleer faktör kappa B (NF- κ B) aktivasyonu ve kemokin ekspresyonunu arttırabileceğini rapor etmiştir. *H. pylori* LPS'inin TLR4 ile etkileşimi daha zayıf olup, bu durum bakterinin bağışıklık sistemi tarafından tanınma ve inflamatuvar yanıt tetikleme kapasitesini azaltmaktadır. Bu özellik, bakterinin kronik enfeksiyonlar oluşturmaya ve uzun süreli mide mukozasında kalmasına olanak tanımaktadır. Dış zarda çeşitli adhesinler (bağlanma proteinleri) bulunmaktadır. Bu adhesinler, bakterinin mide epitel hücrelerine bağlanmasını sağlamaktadır. BabA (Blood-group antigen-binding adhesion) kan grubu antijenlerine bağlanarak *H. pylori*'nin mide epiteline tutunmasını sağlamaktadır. Özellikle Lewis b antijenine ve H1 antijenine bağlanabilmektedir. BabA, *H. pylori*'nin mide epiteline sıkıca bağlanmasına yardımcı olarak CagA gibi diğer virulans faktörlerinin hücreye taşınmasını kolaylaştırmaktadır. SabA (Sialic acid-binding adhesin) sialik asit içeren glikolipidlere, özellikle sialyl-Lewis x ve sialyl-Lewis a antijenlerine bağlanmaktadır. Bu adhesin, özellikle mide mukozasının inflamasyonu sırasında önem kazanmaktadır, çünkü sialik asit modifiye glikolipidler inflamasyon sırasında artmaktadır ve bu da SabA'nın bağlanma yeteneğini arttırmaktadır (Posselt vd., 2013; Oleastro ve Menard, 2013; Sedarat ve Taylor-Robinson, 2024).

CagA (Cytotoxin-associated gene A), *H. pylori*'nin patogenezinde rol oynamaktadır. CagA, Tip IV sekresyon sistemi aracılığıyla bakteriden konak hücrelere enjekte edilmektedir ve bakterinin mide epitel hücrelerine tutunmasını, enfeksiyon oluşmasını sağlamaktadır. CagA, konak konak hücrelere girdikten sonra hücresel sinyal yollarını değiştirerek hücre şekli, proliferasyonu ve motilitesinde değişikliklere neden olmaktadır. CagA, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) gibi

inflamatuvar yolakları aktive ederek, sitokin üretimini ve inflamatuvar yanıtları arttırmaktadır. Kronik inflamasyon, hücresel hasar ve sürekli hücresel yenilenme, mide epitelyumunda metaplazi ve displaziye neden olabilmektedir böylece gastrik kanser riski artmaktadır (Garruti vd., 2021).

dupA (duodenal ulcer promoting gene A) geminin *H. pylori*'nin patojenezinde önemli bir gen olduğu kabul edilmiştir. Bu genin varlığı veya yokluğu, *H. pylori* enfeksiyonunun klinik seyri ve hastalık sonucunu etkileyebilmektedir. İlk olarak 2005 yılında tanımlanmıştır ve peptik ülser hastalığı olan bireylerde daha az bulunduğu rapor edilmiştir. dupA'nın fonksiyonları ve etkileri tam olarak anlaşılmamış olsa da, bazı çalışmalarda onun *H. pylori*'nin gastrik mukozaya bağlanmasını arttırabileceğini, bağışıklık yanıtlarını değiştirebileceğini ve gastrik mukozanın inflamatuvar yanıtını etkileyebileceğini öne sürülmektedir. dupA'nın varlığı veya yokluğunun, *H. pylori* enfeksiyonunun klinik seyrini ve hastanın peptik ülser geliştirme riskini etkileyebileceğini düşündürmektedir, bu alandaki çalışmalar devam etmektedir (Abadi vd., 2016).

2.6.3. *Candida-H. pylori* endofungal birlikteliği:

Endofungal bakteriler fungusun sitozol veya vakuolünde yaşamaktadır ve bu durumun hem fungus hem de endofungal bakteri arasındaki ilişki türüne ve adaptasyon süreçlerine bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir. Fungal sitozolde yaşayan endofungal bakteriler genellikle daha yakın ve mutualistik bir ilişki kurmaktadır. Bu endofungal bakteriler fungal hücrelerin sitozolüne yerleşerek doğrudan besin maddelerine ve metabolik ürünlere erişebilmektedirler. Böylece endofungal bakteriler yaşamlarını sürdürebilmek ve çoğalabilmek için elverişli ortam sağlamış olurlar. Sitozolde yaşayan endofungal bakteriler fungal savunma mekanizmalarına karşı direnç geliştirmiştir ve bu kompartmanda aktif olarak metabolik fonksiyonlarını sürdürebilmektedirler. Bu birliktelik endofungal bakterilerin daha uygun bir yaşam ortamı bulmalarına ve fungusun büyümesine veya patojenlere karşı direncini artırmasına yardımcı olabilmektedir.

Fungal vakuolde yaşayan endofungal bakteriler fungusun savunma mekanizmalarından korunmak için bu kompartmanda yer almaktadır. Fungal vakuoller, hücresel atıkların depolandığı ve hücresel homeostazın sağlandığı yerler olduğundan, burada yaşayan endofungal bakteriler, fungusun savunma sisteminden kaçarak hayatta kalabilmektedirler. Bu iki farklı yerleşim stratejisi, endofungal bakterilerin funguslarla endofungal ilişkiler geliştirmesine ve bu ilişkileri devam ettirmesine olanak tanımaktadır. Sitozolde yaşayan endofungal bakterilerin funguslarla daha yakın bir ilişki kurarak metabolik avantajlar elde ettiği düşünülürken, vakuolde yaşayan endofungal bakterilerin daha güvenli bir ortamda yaşayarak uzun süre hayatta kalabildikleri düşünülmektedir. Endofungal bakterilerin bu farklı hücresel kompartmanlarda yaşama nedenlerinin evrimsel adaptasyon ve konukçu-mikroorganizma ilişkilerine dayandığı düşünülmektedir. Her iki durumda da endofungal bakterilerin funguslarla simbiyotik ilişki geliştirmesine ve bu ilişkiyi devam ettirmesine olanak tanımaktadır.

Son yıllarda yapılan bazı in vivo ve in vitro çalışmalarda, *H. pylori*'nin gastrik epitel hücreleri, makrofajlar ve dentrik hücreler gibi bağışıklık hücrelerinde, amipler ve *Candida* mayaları gibi çeşitli ökaryotik hücreler içerisinde barınabileceği gösterilmiştir. İnsan vücudunda veya belirli koşullar altında, başta *H.pylori* olmak üzere birçok bakteri *Candida* türlerinin vakuollerini istila edebilmektedir (Alipour ve Gaeini, 2017). Maya vakuolleri bakterileri çevresel streslerden korumaktadır ve çeşitli besinler sağlamaktadır (Siavoshi vd., 2003; Sánchez-Alonzo vd., 2020). Fungus vakuölü, bitki vakuolleri ve memeli lizozomlarıyla belirli benzerliklere sahip asidik bir depolama bölmesidir. Vakuollerin çeşitli işlevleri arasında glikoprotein dönüşümü ve hidrolizi, Ca^{2+} , fosfat ve amino asitlerin depolanması, pH ve ozmotik düzenleme, iyon homeostazisi ve sitoplazmik detoksifikasyon yer almaktadır. Vakuoller ayrıca biyosentetik, endositotik ve otofajik hücresel yollardan gelen membranları da içermektedir (Siavoshi ve Saniee, 2014).

Fungal sitoplazmik membrandaki ergosterol, omurgalılarıdaki kolesterole benzer şekilde, membran lipidlerinin önemli bir bileşenidir ve çiftleşme ve

endositoz sırasında plazma membran füzyonu da dahil olmak üzere çeşitli fungal hücresel süreçlerde rol oynamaktadırlar (Weisman, 2003). Ayrıca fungal vakuollerin ve diğer hücre içi organellerin zarlarında önemli miktarda ergosterol bulunmaktadır. Endofungal olarak bulunan *Helicobacter* cinsi üyelerinin hücre zarlarında da büyük miktarda ergosterol bulunmaktadır. Ergosterol, *H. pylori*'deki hücresel nötr lipidlerin yaklaşık %70'ini oluşturur; bu oran, *Escherichia coli* (*E. coli*) için %17 olan orandan çok daha yüksektir. Bu oran, ökaryotik fungal konukçu ile simbiyotik ilişkinin bir sonucu olarak gelişmiştir (Haque vd., 1996). Raporlara göre *H. pylori*'de ergosterol varlığı konukçu kolonizasyonu, patojenite ve antibiyotik direnci açısından önemli olduğu düşünülmektedir (Siavoshi ve Saniee, 2014).

H. pylori maya yanında diğer ökaryotik hücreler içerisinde de bulunabilmektedir. *H. pylori* konak kolesterolünü alarak glikozilasyon yoluyla değiştirmektedir ve glikozillenmiş kolesterolü cgt tarafından kodlanan bir kolesterol glukozil transferazı aracılığıyla kendi yüzeyine dahil etmektedir. *H. pylori*'nin kolesterol varlığında ve yokluğunda kültüre edilmesi ve in vivo kolonizasyon yeteneği karşılaştırılmıştır. Bakterilerin iki katına çıkma süreleri kolesterolden büyük ölçüde etkilenmezken, diğer belirgin fenotipik değişiklikler gözlemlenmiştir. Kolesterol içeren ortamda büyütülen *H. pylori* suşu, midede başarılı bir şekilde kolonize olurken, kolesterol olmayan ortamda büyütülen *H. pylori* suşu kolonize olamamıştır (Hildebrandt ve McGee, 2009; Siavoshi ve Saniee, 2014). Kolesterolün alfa-glikozilasyonu, *H. pylori*'nin fagositozunu ve T hücresi aktivasyonunu ortadan kaldırmaktadır ve *Helicobacter* patogenezinin katkıda bulunmaktadır (Wunder vd., 2006). Kolesterolün *H. pylori* antimikrobiyal direnci üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. *H. pylori* 26695 suşu, kolesterol varlığında veya yokluğunda kültüre edilmiştir. İki kültür, 12 antibiyotik, altı antifungal ve yedi antimikrobiyal peptidin (LL-37 katelisin ve insan alfa ve beta defensinleri dahil) eklendiği ortamda inkübasyona tabi tutulmuştur. Test edilen 25 ajandan kolesterolle büyütülen *H. pylori* hücrelerinin, kolesterol olmadan büyütülen *H. pylori* hücrelerine göre 9 ajana karşı önemli ölçüde daha dirençli olduğu tespit edilmiştir (McGee vd., 2011).

Endofungal bakteriler, maya hücresi içinde güvenli bir şekilde hayatta kalmak için kendi proteinlerini ifade etmeye devam etmektedir (Sanjeev vd., 2013). *H. pylori* maya vakuölü içerisinde yaşayabilmek ve hayatta kalmak için proteinlerini eksprese etmektedir. Ökaryotik hücrelerde solunum patlaması sırasında oluşan oksijen metabolitlerini detoksifiye etmek için peroksiredoksin ve tiyol peroksidazı ve makrofajlarda fagolizozom füzyonunu bozmak için üreaz ve vacA'yı eksprese etmektedir (Mauel, 1983; Schwartz ve Allen, 2006).

Fagositik hücrelerin hücre içi mikroorganizmaları yok etmesini sağlayan mekanizmaların anlaşılması son yıllarda önemli ölçüde ilerlemiştir. Fagositlerin mikroorganizmalarla etkileşimi, mikroorganizmaların fagositlere bağlanmasıyla başlamaktadır. Bu bağlanmaya mikroorganizmalar üzerindeki opsoninler aracılık edebilmektedir ve bunlar daha sonra fagosit yüzeyindeki uygun reseptörlerle etkileşime girmektedir. Lektinler gibi diğer reseptör türleri de bu süreçte dahil olabilmektedir. İnternalizasyonun ardından mikroorganizma, fagositik hücrenin plazma zarından türetilen bir kesecik (fagozom) içine alınmaktadır. Fagozom daha sonra normal olarak birincil veya ikincil lizozomlarla füzyona uğrayacaktır. Çeşitli mekanizmalar hücre içi ölüme yol açabilmektedir; bazıları oksidatif süreçlere bağlıdır, bazıları ise oksidatif metabolizmadan bağımsızdır. İlk mekanizma oksijen alımının uyarılmasına ("solunum patlaması") yol açan membran enzim sistemlerinin aktivasyonunu ve bunun mikroorganizmalar için oldukça toksik olan moleküllere indirgenmesini içermektedir. Solunum patlamasının daha büyük olduğu alveolar makrofajlar ve diğer fagositler arasında bu bakımdan farklılıklar olduğu görülmektedir. Oksijenden bağımsız mikroorganizmayı öldüren mekanizmalar asit üretimine, lizozim salgılanmasına, demir bağlayan proteinlere ve toksik katyonik polipeptitlerin sentezine dayanmaktadır. Bazı mikroorganizmalar, fagositler tarafından yok edilmelerini engelleyecek şekilde geliştirmiştir; bunlar makrofajlar ve protozoan parazitler arasındaki etkileşime ilişkin çalışmalarla iyi bir şekilde gösterilmiştir. *Toxoplasma gondii* gibi parazitler (aynı zamanda bazı mikrobakteriler) fagozomların lizozomlarla füzyonunu inhibe edebilir, böylece lizozomal hidrolazların potansiyel olarak zararlı etkisinden kaçabilirler. Diğer mikroorganizmalar, belki de engelleyici maddeler salgılayarak

bu tür enzimlerin etkisine direnebilmektedirler. Diğerleri ise gelişimlerinin engellenmediği sitozolik matrikse ulaşmak için fagositik vakuolden ayrılarak lizozomlardan kaçınırlar. Son olarak bazı mikroorganizmaların, solunum patlaması sırasında oluşan oksijen metabolitlerini detoksifiye edecek enzimleri vardır. Bu nedenle hücre içi ölüm veya hayatta kalma, bazıları çeşitli faktörlerin genetik olarak kontrol edilmesine bağlıdır.

Hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin indirgenmesini katalize eden enzimler olan peroksiredoksinler, organizmaları reaktif oksijen türlerinin verdiği hasardan koruyan yaygın proteinlerdir. *Helicobacter pylori*, peroksiredoksin ailesinin üç üyesini içerir: AhpC (alkil hidroperoksit redüktaz), Tpx (tiyol-spesifik peroksidaz) ve bakteriyoferritin komigrator proteini (BCP). *H. pylori*'de peroksiredoksin ve tiyol peroksidaz üreterek fagositik bağışıklık hücrelerinin solunum patlamasını önlemektedirler (Mauel, 1983; Siavoshi vd., 2019).

Fagositoz, istilacı mikroorganizmaları öldürmek için önemli olan, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin bir unsurudur. Mide mukozasında fagositlerin birikimi, *H. pylori* kaynaklı inflamasyonun karakteristik bir özelliğidir. *H. pylori*'nin fagosit açısından zengin bir ortamda gelişebilme yeteneği rapor edilmiş olmasına rağmen, bakterilerin doğuştan gelen bağışıklık tepkisi aracılığıyla eliminasyondan nasıl kurtulduğu kısmen anlaşılmıştır. İn vivo ve in vitro çalışmaların sonuçları, *H. pylori*'nin makrofajlar ve nötrofiller tarafından yutulduğunu, ancak yutulan mikroorganizmaların yalnızca %50'sinin öldürüldüğünü göstermektedir. *H. pylori*'nin makrofajlar tarafından öldürülmekten kaçma yeteneğinin, bu organizmaların atipik protein kinaz C-yi (PKC) aktive etme ve fagositozu geciktirme yeteneği ile doğrudan ilişkili olduğunu daha önce rapor edilmiştir. *H. pylori* fagozomlarda kümelenmeye ve homotipik füzyona uğramaktadır ve bakteriler, ortaya çıkan megazomların içinde en az 24 saat boyunca hayatta kalabilmektedir. *H. pylori* fagozom olgunlaşmasını inhibe etmektedir ve megazomlar koronin ve erken endozom otoantijen 1'i (EEA1) biriktirmektedir. VacA kısmende olsa fagozom-lizozom füzyonunun bloke edilmesini düzenlemektedir. Buna karşılık megazom oluşumunu düzenleyen virülans

faktörleri bilinmemektedir. Sonuçta enfekte makrofajlar apoptoza ve canlı bakterilere maruz kalır ve serbest kalırlar. Bu veriler ışığında, *H.pylori*'nin bakteriyel kalıcılığı destekleyen ve tedavi başarısızlığına katkıda bulunan korumalı bir hücre içi nişi işgal ettiği ileri sürülmüştür. Üreaz kolonizasyondaki rolüne ek olarak *H. pylori*-makrofaj etkileşimlerini de düzenlemektedir. Bu enzim, makrofajları enfekte mideye toplayan kemotaktik bir ajandır. Üreaz aynı zamanda fagositozu da düzenlemektedir. Üreaz megazom oluşumunda ve *H. pylori*'nin hayatta kalmasında önemlidir (Schwartz ve Allen, 2006).

Candida içerisinde yaşayan endofungal bakterilere dair çalışmalar alt bölümde özetlenmiştir. Bu konudaki araştırmaların çoğu *Candida*-*H. pylori* ve *Candida* –*Staphylococcus* arasındaki ilişki üzerine yoğunlaşmıştır. Endofungal gelişimin klinik önemi göz önünde alındığında funguslar içerisinde yaşayan endofungal bakteri çeşitliliğini araştırmak tedavi stratejileri açısından önemlidir.

Siavoshi ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı bir çalışmada ağız boşluğundan izole edilen mayalarda *Helicobacter pylori*-spesifik genler araştırılmıştır. Çalışma sonucunda doğada bol miktarda bulunan ve bireylerin mukozal yüzeylerinde gelişebilen mayaların, *H. pylori*'nin rezervuarı ve taşıyıcısı olarak hizmet edebileceği öngörülmüştür (Siavoshi vd., 2005).

Salmanian ve arkadaşları, 2008 yılında ağız boşluğundan izole edilen mayaların *H. pylori* için rezervuar görevi görebileceğine dair bir çalışma yapmışlardır. *H. pylori*'ye karşı uygulanan antimikrobiyal tedavinin başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olan durumun, bakterinin kendisini maya hücresi içerisinde saklayarak uygulanan tedaviye direnç gösterdiği yönünde yorumlamışlardır. Bu endofungal ilişki, *H. pylori*'nin ağız boşluğundaki kalıcılığını açıklayabilmektedir. Sonuç olarak midenin; ağız boşluğunun kalıcı sakinleri olan *H. pylori* bakterileri tarafından yeniden aşılabilmesi ve insan popülasyonları arasında enfeksiyonun yayılmasına neden olabileceği düşünülmektedir (Salmanian vd., 2008).

Saniee ve arkadaşları, 2013 yılında yaptığı bir çalışmada immunofloresan teknikler kullanarak oral ve gastrik örneklerden izole edilen *Candida* mayasının vakuolünün içindeki *H. pylori*'nin lokalizasyonunu belirlemişlerdir (Saniee vd., 2013a).

Saniee ve arkadaşları, 2013 yılında yaptıkları başka bir çalışmada oral ve gastrik örneklerden izole edilen mayalarda *H. pylori*'ye özgü proteinleri westem blotlama ile saptamışlardır (Saniee vd., 2013b).

Siavoshi ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı başka bir çalışmada anne adaylarının oral ve vajinal örneklerinden ve yeni doğanların oral örneklerinden izole ettikleri mayalarda hücre içi *H.pylori* varlığı ve mayaların bakteriyel transmisyonadaki olası rollerini incelemişlerdir. *H. pylori* genlerinin vajinal mayalarda ve yeni doğanların oral mayalarında görülmesi, annelerin vajinal mayalarında *H. pylori* genlerinin tespit edilmesiyle annelerde UBT + sonuçları arasında anlamlı bir ilişki görülmüştür (Siavoshi vd., 2013c).

Matamala-Valdés ve arkadaşları yeni doğanların dışkısında ve bu yaş grubunun ağız boşluğunu kolonize eden mayalarda *H. pylori* varlığına dair kanıtları güçlendirmek amacıyla bu konuda bir çalışma yapmıştır. Bu çalışma yeni doğanlardaki hücre içi *H. pylori* varlığını kanıtlamıştır (Matamala-Valdés vd., 2018).

Tavakolian ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı bir çalışmada *C. albicans* vakuolü içerisindeki *Staphylococcus*'un lokalizasyonu araştırılmıştır. Floresan etiketli oligonukleotid probler veya antikorlar, hücre-içi endofungal bakterilerin tanımlanması ve lokalizasyonu için spesifik, güçlü araçlar olarak kullanılmıştır (Tavakolian vd., 2019).

Sánchez-Alonzo ve arkadaşları oral mayaların içinde *H. pylori* varlığını tespit etmek amacıyla çalışma yapmışlardır. Çalışmanın sonuçları oral mayalarda *H. pylori*'nin hücre içi varlığı, bu mikroorganizmalar arasında *H. pylori*

transmisyonunu ve gastrointestinal kanalda yeniden enfeksiyonu destekleyebilecek endofungal bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (Sánchez-Alonzo vd., 2020).

Sánchez-Alonzo ve arkadaşları 2021 yılında yaptığı çalışmada vajinal maya hücreleri içinde yaşayan hücre içi *H. pylori*'nin virulans genlerinin varlığını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda virulans genlerine sahip olan *H. pylori*'nin vajinal mayalarda saptanması bu patojenin vertikal geçişiyle birlikte risk teşkil ettiği sonucuna varılmıştır. (Sánchez-Alonzo vd., 2021).

Yang ve arkadaşlarının 2024 yılında yaptığı bir çalışmada gastrik biyopsi örneklerinden ve vajinal akıntıdan izole edilen *Candida* türlerinde hücre-içi *H. pylori* antijenlerinin ve *cagA*, *ureA*, *16S rDNA* gen bölgesinin varlığı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda araştırılan genler PCR ile tespit edilmiştir ve *H. pylori* antijenleri immunofloresan tekniklerle tespit edilmiştir (Yang vd., 2024).

Klinik örneklerin yanı sıra çevresel örneklerden ve gıdalardan izole edilen mayalar içerisinde de endofungal bakteriler bulunduğu yapılan birkaç çalışmada rapor edilmiştir. Siavoshi ve arkadaşları insanlarda *H. pylori* enfeksiyonunu kontrol etmek için çevresel rezervuarın belirlenmesine dair bir çalışma yapmışlardır (Siavoshi vd., 2018). Bu çalışmada oral örnekler, çiçekler, meyveler, bal, bal arıları ve çeşitli örneklerden izole edilen mayalar içerisinde endofungal *H. pylori* tespit etmişlerdir. Diğer çalışmalardan farklı olarak *Candida*'nın yanı sıra *Komagataella*, *Pichia*, *Cytobasidia*, *Hansenia*, *Meyerozyma* genusu üyelerinde endofungal *H. pylori* saptanmıştır. Bal arılarının mayaların ana rezervuarları olarak görev yaptıkları ve mayaların korunmasında ve dağılmasında rol aldıkları düşünülmektedir. Mayaların içindeki endofungal *H. pylori*, bal arıları tarafından şeker ve besin açısından zengin farklı ortamlara taşınabilmektedir. *H. pylori* pozitif mayaların doğada dağılımında şeker açısından zengin ortamlar ve bal arıları önemli rol oynamaktadır (Siavoshi vd., 2018).

Siavoshi ve arkadaşları 2020 yılında yaptığı bir çalışmada şeker açısından zengin gıdalardan izole edilen maya izolatlarında hücre içi *H. pylori* ve

Staphylococcus spp. varlığını incelemişlerdir. PCR analizi sonucunda bazı mayalarda sadece *H. pylori*, bazılarında sadece *Staphylococcus* bazılarında her iki bakteride saptanmıştır. Böylece bu sonuçlar mayaların vakuollerinde birden fazla endofungal bakterinin var olabileceğini göstermiştir. Mayada *H. pylori* ve *Staphylococcus*'un birlikteliği sofistike bir hayatta kalma stratejisi iken, maya güçlü bir bakteri deposu görevi görmektedir (Siavoshi vd., 2020).

Yapılan çalışmalara göre *H. pylori*'nin transmisyonunda rol oynayan faktörlerle ilgili daha fazla araştırma yapılmalıdır. Belki de *H. pylori* enfeksiyonunun kontrol etmek için çevrede *H. pylori*'nin rezervuarı olabilecek daha farklı ortamlar ve canlılar bulunabilmektedir.

Oral, gastrik, vajinal ve gıda örneklerinden izole edilen mayalar içerisindeki endofungal bakterilere dair çalışmalar bulunmaktadır ve Tablo 2.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. *Candida* spp. içinde yaşayan endofungal bakteriler

Endofungal Bakteri	<i>Candida</i> Türü	İnternalizasyonu Veya Yüzeyle Bağlanmayı Belirleyen Faktörler	Endofungal Bakterilerin Tespit Edilme Yöntemi
<i>H. pylori</i>	<i>C. albicans</i>	Gastrik çevre	FISH ve 16S rDNA
<i>L.monocytogenes</i>	<i>C. albicans</i>	Kloramfenikol, Sıcaklık	Floresan mikroskopisi ve PCR
<i>H. pylori</i>	<i>C.albicans</i>	Amoksisilin	16S rDNA ve Floresan mikroskopisi (Canlı/Ölü BacLight boyama yöntemi)
<i>H. pylori</i>	<i>Candida</i> spp.	Ağız boşluğu	16S rDNA ve ışık mikroskobu incelemesi
<i>Arthrobacter parietis</i> , <i>Cellulomonas hominis</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>C.albicans</i> , <i>C. tropicalis</i>	Yaşlanma ve Açlık stresi	16S rDNA ve Floresan mikroskopisi
<i>H. pylori</i>	<i>C. albicans</i>	pH 3,4	16S rDNA ve Fluorescein, isothiocyanate
<i>H. pylori</i>	<i>C. albicans</i>	Vajinal çevre	16S rDNA ve Fluorescein, isothiocyanate
<i>H. pylori</i>	<i>Candida</i> spp.	FITC-Conjugated IgYHp	16S rRNA, Fluorescent microscopy (Live/Dead BacLight staining method)
<i>H. pylori</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i>	Besin eksikliği	16S rRNA ve FISH
<i>H. pylori</i>	<i>C. glabrata</i>	Anaerobik koşullar	16S rRNA ve FISH
<i>H. pylori</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i>	Sıcaklık	16S rRNA ve FISH

Tablo 2.1. Devam

Endofungal Bakteri	<i>Candida</i> Türü	İnternalizasyonu Veya Yüze Bağlanmayı Belirleyen Faktörler	Endofungal Bakterilerin Tespit Edilme Yöntemi
<i>H. pylori</i> , <i>Staphylococcus spp.</i>	<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. albicans</i>	Yüksek şekerli ortam	16S rDNA ve FISH
<i>H. pylori</i>	<i>C. albicans</i>	Ağız boşluğu	Mikroskopik inceleme ve PCR
<i>H. pylori</i>	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i>	Ağız boşluğu ve gastrik ortam	Işık mikroskopisi ve PCR

2.6.4. *H. pylori*'nin *Candida* içerisine giriş mekanizması:

Endofungal bakterilerin hangi koşullar altında kendilerini maya hücrelerinin içine saklaması da büyük bir araştırma konusudur. Bu alanda daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. İnsan sağlığı açısından oldukça önem taşıyan *H. pylori*'nin kendini maya içerisine saklamasına neden olan faktörlere dair çalışmalar son yıllarda yapılan birkaç çalışmayla sınırlı kalmıştır ve mekanizma henüz netliğe kavuşmamıştır.

Maya hücre duvarı, manoproteinler, β -1,3- ve β -1,6-glukanlardan oluşmaktadır. Glukanlar, hücre duvarının bütünlüğünden, şeklinden ve esnekliğinden sorumludur. Maya hücre duvarı lizisi için birkaç enzimin sinerjistik etkisi gerekli olmasına rağmen, β -1,3-glukanazlar litik aktivitede önemli bir rol

oynamaktadır. Bakteriler fungal hücre duvarını parçalayan önemli enzim kaynakları olarak kabul edilmektedir. *Bacillus* genusu üyelerinin besine ulaşmak için glukanaazları kullanarak fungal hücre duvarını parçaladığını gösteren raporlar bulunmaktadır. *Arthrobacter luteus*, maya hücre duvarında yüksek litik aktiviteye sahip endoglukanazlar üretmektedir. Bu raporların sonuçları, bakterilerin funguslara karşı kendilerini korumak için veya funguslardan yararlanmak için maya hücrelerini parçalamayı öğrendiklerini göstermektedir (Flieger vd., 2018). Farklı bakteriler, kitini parçalayarak karbon ve azot kaynağı olarak kullanmak amacı ile kitinaz sentezlemektedir ve aynı zamanda kitinaz enziminin *Legionella pneumophila*'nın alveoler mukoza boyunca hareket etmesine izin veren bir virülans faktörü olduğu rapor edilmiştir (Rehman vd., 2020). Hücre duvarını parçalayan enzimlere sahip diğer bakteriler gibi *H. pylori* suşlarında maya duvarını parçalayan enzimleri üretilip üretilmediği araştırılmalıdır.

H. pylori oldukça asidik bir ortam olan insan midesinde (pH:2-3) kolonize olmaktadır. *H. pylori* mide ortamında amonyum ve CO₂ üretmek üzere üreyi hidrolize etmek için üreaz enzimi salgılamaktadır ve böylece pH'yı nötralize etmektedir. Yapılan bir çalışmada *H. pylori* 'nin büyük ölçüde kendisi için uygun olmayan pH değerlerinde (pH:3 ve pH:4) *C. albicans* içine saklandığı vurgusu yapılmıştır. Mayalar geniş pH aralığına (2 ila 10) uyum sağlayabilirken, fakültatif bir hücre içi bakteri olan *H. pylori*, pH 6 ila 8 aralığına uyum sağlayabilmektedir. Yapılan çalışmada *H. pylori*, pH 3 ve 4'te; pH 7'den daha büyük ölüm yüzdeleri göstermiştir. Mayanın canlılığı farklı pH'ların hiçbirinden etkilenmemiştir. *H. pylori* test edilen tüm pH değerlerinde, ancak daha büyük ölçüde uygun olmayan pH değerlerinde (sırasıyla pH 3 veya 4, p = 0,014 ve p = 0,001) *C. albicans* içerisine girmiştir. Düşük pH organizma için stres oluşturmuş, bu nedenle de maya içine girmesini tetiklemiştir. Bu bilgiler ışığında olumsuz pH koşullarının bakterinin mayanın içerisine girmesine neden olabilecek bir stres faktörü olduğu düşünülmektedir (Sanchez-Alonzo vd., 2020).

Bakterilerin maya içerisinde saklanması tetikleyen bir diğer faktörün antibiyotikler olduğu düşünülmektedir. Farklı antibiyotiklerin kullanıldığı üçlü

veya dörtlü tedavi stratejileri, *H. pylori*'nin artan ilaç direnci nedeniyle, *H. pylori* enfeksiyonunu kademeli olarak yok etmede başarısız olmuştur. Ayrıca tedavinin verimsizliğinin nedenlerinden birinin *H. pylori*'nin hücre içi fakültatif doğası olduğu düşünülmektedir. *H. pylori* tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin (amoksisilin ve klaritromisin) stres faktörü olup olmadığının değerlendirildiği bir ortak kültür çalışmasında, bu antibiyotiklerden amoksisilinin ortama eklenmesiyle bakterinin kendisini maya hücresinin içerisine gizlediği tespit edilmiştir. Böylece farklı antibiyotiklerin *H. pylori*'nin *C. albicans* içine girişini tetikleyebileceğini ve bu nedenle, *H. pylori* ve *C. albicans* etkileşiminin, anti-*H. pylori* tedavilerinin başarısız olmasına neden olabilecek bakteri-maya ilişkisi olduğu düşünülmektedir (Sanchez-Alonzo vd., 2021a).

Sánchez-Alonzo ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptığı bir çalışma da kültür ortamındaki besin konsantrasyonundaki değişikliklerin *H. pylori*'nin *Candida* vakuolü içerisine girişini tetikleyip tetiklemediği in vitro olarak değerlendirilmiştir. *H. pylori*–*Candida* ortak kültürleri için %1, %5 veya %20 fetal bovin serumu veya salin solüsyonu ilave edilmiş Brucella broth kullanılmıştır. Işık mikroskobu altında yapılan incelemelerde maya içi bakteri benzeri cisimler (BLB'ler) gözlenmiştir. FISH ve PCR teknikleri kullanılarak maya içi BLB'ler *H. pylori* olarak tanımlanmıştır. Maya içi *H. pylori* canlılığı, LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability kiti kullanılarak doğrulanmıştır. Birlikte kültürlenen bakteri maya suşlarının tüm kombinasyonlarında maya içi *H. pylori* mevcuttur. Bununla birlikte, bakterileri barındıran maya hücrelerinin yüzdeleri, besin konsantrasyonlarına göre değişmiştir ve ayrıca suřa bağımlıdır. Sonuç olarak, besin konsantrasyonundaki düşüş *H. pylori*'yi strese sokarak *Candida* hücrelerine girişini teşvik etmektedir. Hem *H. pylori* hem de *Candida* suşlarının besinsiz bırakılması, bakteri barındıran maya hücrelerinin yüzdelerini azaltmıştır, bu da açlıktan ölmekte olan maya hücrelerinin *H. pylori* hücrelerini barındırma konusunda daha az yetenekli olabileceğini dşndrmştir. *H. pylori* ve *Candida* arasındaki endofungal ilişkinin, birlikte kültürlenen suşlara bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (Sanchez-Alonzo vd., 2021b).

Sanchez-Alonzo ve arkadaşları *H. pylori*'nin maya hücresine girişinde rol oynayan çevresel faktörlerin araştırılmasına devam etmiştir. Bu amaçla 2021 yılında yaptıkları bir çalışmada sıcaklık değişikliklerinin *H. pylori*'nin *Candida*'ya girişini teşvik edip etmediğini ve bu birlikteliğin bakteriyel canlılığı destekleyip desteklemediğini değerlendirmiştir. Gıda dahil diğer kaynaklardan veya depolama sıcaklığı *H. pylori* için optimal büyüme aralığı olan 30-37 °C'nin dışında olduğunda, maya içi *H. pylori* varlığını rapor eden çalışmalar bulunmaktadır. *H. pylori*'nin iki mikroorganizmanında 40 °C'de birlikte kültüre edilmesi durumunda mayaya karşı istilacılığını önemli ölçüde arttırdığı gözlenmiştir (Sanchez-Alonzo vd., 2021c).

Sanchez-Alonzo ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptığı başka bir çalışmada, oksijen konsantrasyonundaki değişikliklerin *H. pylori*'nin *Candida* hücrelerinin içerisine girişini destekleyip desteklemediğini araştırmışlardır. Oksijen konsantrasyonu gibi stres faktörleri *H. pylori* mide ortamı dışında yaşayabilirliğini etkilemektedir. Bu çalışmada *H. pylori* ve *Candida* suşlarının ortak kültürleri %5 fetal sıgır serumu eklenmiş Brucella besiyerinde, mikroaerofilik, anaerobik veya aerobik koşullar altında inkübe edilmiştir. Ortak kültürlerin ışık mikroskobu altındaki incelemesi sonucunda BLB'ler tespit edilmiştir ve moleküler teknikler kullanılarak tanımlanmıştır. Maya içerisinde yaşayan bakterilerin canlılığı SYTO-9 floresansı ile değerlendirilmiştir. Üç koşul altında inkübe edilen ortak kültürlerde, içerisinde bakteri bulunan maya yüzdesinin en yüksek olduğu koşulların anaerobik koşullar olduğu belirlenmiştir ve bu birlikteliğin *H. pylori* J99 ve *C. glabrata* suşları arasında gerçekleştiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, *H. pylori* belirgin stres koşulları olmadan *Candida* maya hücrelerinde barınmasına rağmen, anaerobik koşullar maya içerisine bakteri girişini arttırmaktadır. Bu çalışmada endofungal birlikteliğin aynı zamanda çoğunlukla ortak kültürde kullanılan *H. pylori* suşuna bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (Sanchez-Alonzo vd., 2022).

Sanchez-Alonzo ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda, *H. pylori*'nin pH' taki değişiklikler, sıcaklık, antibiyotiklerin varlığı veya canlılıklarını etkileyen besin maddelerindeki değişiklikler gibi çevresel faktörlerden kendisini korumak için mayayı istila ettiği gösterilmiştir (Sanchez-Alonzo vd., 2020;

Sanchez-Alonzo vd., 2021a; Sanchez-Alonzo vd., 2021b; Sanchez-Alonzo vd., 2021c; Sanchez-Alonzo vd., 2022).

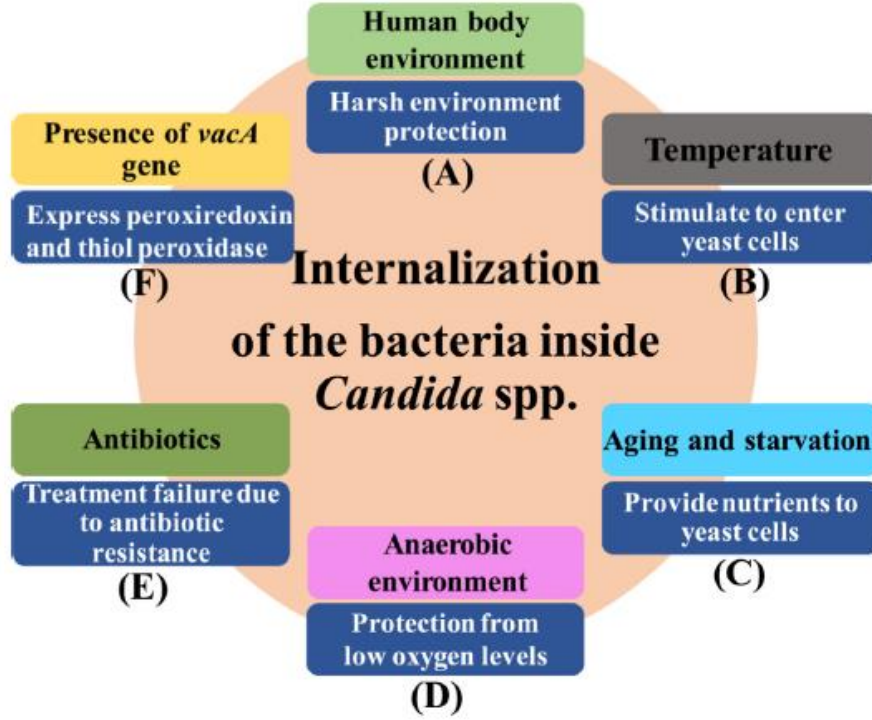
Castro-Seriche ve arkadaşları endofungal bakterilerin fungal hücre içine saklanmasına neden olan faktörlerin araştırılmasına dair çalışma gerçekleştirilmiştir (Castro-Seriche vd.,2021). Bu çalışmada *Listeria monocytogenes*'in *C. albicans* hücrelerine girişi test edilmiştir. *L. monocytogenes*, gıda kaynaklı hastalıkların önemli bir nedeni olmaya devam eden patojenik, fakültatif anaerobik Gram pozitif bir basildir (Shamloo vd., 2019). Günümüzde bu bakteri, geniş bir sıcaklık aralığında çoğalma ve olumsuz ortamlarda uzun süre boyunca varlığını sürdürme yeteneği nedeniyle kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır (Ringus ve diğerleri, 2012). Organizma kısmen düşük pH'a (2 saat boyunca pH 2,4), yüksek sıcaklıklara (40 dakika boyunca 55 C°) (Mag-alhaes vd., 2016), tuzlu koşullara (%12), safra asidine karşı yüksek toleransa sahiptir (Ringus vd., 2012).

Enfeksiyon, bağırsak epitelinden geçen hücre içi bir patojen olan *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesinden sonra meydana gelmektedir (Ortega vd., 2019). Bağırsak lümenine girdikten sonra, bu bakterinin bir dizi yüzey proteini, çok çeşitli konukçu hücreleri istila etmesine katkıda bulunmaktadır (Orsi vd., 2011; Radoshevich ve Cossart, 2018). *L. monocytogenes*'in fagositik hücreleri istila edebildiği, konukçu sitozolünde hızla çoğaldığı ve aktin tabanlı hareketlilik aracılığıyla hücreden hücreye yayılabildiği rapor edilmiştir (Cheng ve ark., 2018). İnsanlar tarafından tüketilen birçok gıdanın kendileri için zararsız olan mayalar içerdiği ancak bunların *L. monocytogenes*'in hayatta kalmasına yardımcı olabileceği de dikkate alınmalıdır. *L. monocytogenes* sayısının *C. tropicalis* ve *C. krusei* ile birlikte biyofilm oluşturduğunda önemli oranda artış gösterdiği gözlenmiştir (Agustín ve Brugnoli, 2018).

L. monocytogenes'in stresli koşullara dirençli olması ve ökaryotik hücreleri enfekte etme yeteneği sayesinde *C. albicans* içerisine girip barınıp barınamayacağı konusunda deneme yapılmıştır. Bu çalışma da bakterinin maya hücresi içerisine

girişini tetikleyecek stres faktörü olarak sıcaklık ve kloramfenikol test edilmiştir. Bu çalışmanın amacı *L. monocytogenes*'in *C. albicans* hücreleri içinde canlılığını koruyarak barınıp barınamayacağını konusunda maya hücrelerine girişi tetikleyen stres faktörlerinden sıcaklığın ve antibiyotiğin (kloramfenikol) etkisini değerlendirmektir. Her iki mikroorganizma da 48 saat boyunca BHI sıvı besiyerinde birlikte inkübe edilmiştir ve 0, 1, 3, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde örnek alınarak ışık mikroskobu altında bakterilerin maya hücrelerine girişi değerlendirilmiştir. 48 saat sonunda hücre-dışı bakteri içermeyen ortak kültürün kloramfenikol içeren maya besiyeri ortamına ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücre-dışı bakteri içermeyen mayaların total DNA'sı kullanılarak, maya içerisinde yaşayan bakterilerin 16S rDNA gen bölgesi amplifiye edilmiştir. Sıcaklığın ve kloramfenikolün maya hücrelerine bakteri giriş hızı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Her iki mikroorganizmanın birlikte kültürlenmesinden sonra hazırlanan preparatların mikroskopik incelemesi maya hücreleri içindeki hareketli bakterilerin varlığını göstermiştir ve transmisyon elektron mikroskobu maya içi bakterilerin varlığını doğrulamıştır. Hücre dışı bakteri içermeyen mayalardan elde edilen *C. albicans* total DNA'sındaki *L. monocytogenes*'in iap geninin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Mayaların vakuelleri içindeki bakteri hücrelerinde gözlenen SYTO 9 yeşil floresansı, maya içi bakterilerin canlı kaldığını göstermektedir. Ayrıca *L. monocytogenes*'in maya hücrelerine girişi, stres faktörlerinin (kloramfenikol ve sıcaklık) varlığıyla kolaylaştırılmıştır. Böylece mayalar, canlı *L. monocytogenes*'in rezervuarı olabilir ve bu bakterileri sonraki maya nesillerine aktarabilmektedir (Castro-Seriche vd.,2021).

Candida türlerinin içindeki endofungal bakterilerin internalizasyonunu etkileyen çoklu çevresel faktörler özetlenmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Endofungal bakterilerin *Candida* türlerinin içerisine girişini etkileyen faktörler A)İnsan vücudundaki elverişsiz ortam B)Sıcaklık C) Yaşlanma ve açlık faktörleri D)Anaerobik ortam E)Antibiyotik stresi F)*vacA* geninin varlığı (Khan vd., 2023)

Candida türleri içerisinde yaşayan endofungal bakterilerin internalizasyonunu etkileyen faktörlerin net olarak belirlenmesi tedavi stratejileri açısından önem taşımaktadır.

2.6.5. *H. pylori*'nin *Candida* içerisinden çıkış mekanizması:

Mayadan *H. pylori* salınımını hangi mekanizma ile gerçekleştiği konusu 2020 yılında yapılan bir çalışma da araştırılmıştır (Heydari vd, 2020). Mayadan hücre-içi bakterilerin kaçışı; litik ve litik olmayan stratejiler aracılığıyla gerçekleşmektedir (Hybiske ve Stephens, 2015). Litik kaçış stratejisi; hücrenin ve vakuolar membranının lipazlar, proteazlar ve gözenek oluşturan proteinlerle yok edilmesiyle konukçu hücreden bakterilerin salınmasını içermektedir (Flieger vd., 2018). Litik

olmayan kaçış stratejisi; hücre-içi bakteriler ya serbest bakteri olarak ya da konukçu zarları ile kaplanmış şekilde konukçuyu yok etmeden dışarıya salınmasıyla gerçekleşmektedir (Flieger vd., 2018; Ireton vd., 2018).

Litik olmayan kaçışın hücre dışı veziküller aracılığıyla gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Hücre dışı veziküller, tüm canlı hücreler tarafından çevreye salınan zara bağlı yapılardır. Veziküllerin salınması, tüm hücre tiplerinin evriminde korunan bir fenomen olmuştur ve fizyolojik ve patolojik aktivitelerin belirlenmesinde önemli roller oynamaktadır. Bu veziküller yüzlerce farklı molekül taşıyarak hücreler arası iletişime aracılık etmektedir. Hücre dışı veziküller miRNA, mRNA'lar ve DNA gibi proteinler ve nükleik asitler içerebilmektedirler. Veziküllerin, hücreler arasında genetik bilgi transferinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Öte yandan, protozoadan salınan veziküllerin içindeki bakteri hücrelerinin gözlemleri, veziküllerin hücre içi bakterileri taşıyabileceğini göstermiştir (Skog vd., 2008; Deatherage ve Cookson, 2012; Raposo ve Stoorvogel, 2013; Colombo vd., 2014; Thakur vd., 2014; Denoncourt vd., 2014; Choi vd., 2015; Cicero vd., 2015; Heydari vd., 2020).

Heydari ve arkadaşlarının yakın zamanda yaptığı bir çalışmada, hücre-içi *H.pylori*'nin mayadan zara bağlı veya serbest bir bakteri olarak kaçışıyla; onun konukçuya zarar vermeyen güvenli çıkış mekanizmaları kullandığı gösterilmiştir. İnsan midesindeki bazı koşullar maya hücrelerini vezikül kaplı veya serbest olarak *H. pylori*'yi salmaya teşvik edebilmektedir. *H. pylori* taşıyan veziküller bakteriyi korurken, aynı zamanda yeni bir hedef hücreye bakteri girişini kolaylaştırabilmektedir. Maya hücresinden salınan veziküller, *H. pylori*'nin iletimini ve yayılmasını kolaylaştıran güvenli taşıyıcılar olarak hizmet edebilmektedir. Fakat maya hücrelerinin içerisinde barındırdığı bakteriyi dışarıya salmasını teşvik eden insan midesindeki koşullar ve mekanizmalar hala tam olarak netliğe kavuşmamıştır (Heydari vd., 2020a).

Heydari ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı bir çalışmada mayadan *H. pylori*'nin salınımının hangi mekanizmayla gerçekleştiği araştırılmıştır. Bu amaçla

Candida mayasının sıvı kültürü, salınan vezikülleri gözlemek için ışık, floresans ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) altında incelenmiştir. Veziküller izole edilmiştir ve TEM ile incelenmiştir. Veziküllerin zarında *H. pylori*'ye özgü proteinlerin saptanması için immünogold etiketleme kullanılmıştır. Mayadan salınan serbest bakteri hücreleri, immünomanyetik ayırma yöntemiyle ayrılmış ve alan emisyonu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ile gözlemlenmiştir. Boncuklara bağlanan bakterilerin DNA'sı, *H. pylori*-16S rDNA gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılmıştır. Boncuklara bağlı bakterilerin canlılığı, canlı ölü/boyama yapılarak test edilmiştir ve Brucella kanlı agar üzerinde kültüre etme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak mikroskobik gözlemler, veziküllerin bakteri benzeri yapılar içerdiğini açığa çıkarmıştır. İnce kesitler, mayadan vezikül kaplı veya serbest bakteri salınımını göstermiştir. İmmünogold etiketleme, veziküllerin zarında *H. pylori* proteinlerinin varlığını ortaya çıkarmıştır. FESEM, *H. pylori* hücrelerinin manyetik boncuklara bağlandığını göstermiştir. 521 bp'lık PCR ürününün dizilenmesi, boncuklara bağlanan bakterinin kimliğinin *H. pylori* olduğunu doğrulamıştır. Canlı/ölü boyama, boncuğa bağlı *H. pylori*'nin canlılığını göstermiştir fakat *H. pylori* kültüre etme çalışması başarılı olmamıştır (Heydari vd., 2020a). Hücre içi endofungal *H. pylori*'nin mayadan zara bağlı veya serbest bir bakteri olarak salınımı *H. pylori*'nin konukçuya zarar vermeyen güvenli çıkış mekanizmaları kullandığını göstermektedir, bu da simbiyotik ilişkilerin ilkesidir. Böylece insan midesindeki bazı koşulların; maya hücrelerini vezikül kaplı veya serbest olarak *H. pylori* salınmasına teşvik edebileceği sonucuna varılmıştır (Heydari vd., 2020a).

Heydari ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı bir çalışmada yaşlanma ve açlık stresi altında endofungal bakterilerin mayalardan dışarıya salınabilme olasılığı değerlendirilmiştir. Bu çalışma mayalardan hücre-içi endofungal bakterilerin çıkışını (salınımını) teşvik eden stres faktörleri üzerine gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 10 gıda ve 10 mide kaynaklı maya değerlendirilmiştir. Mayalar, *Candida* ve *Saccharomyces* cinsinin üyeleri olarak tanımlanmıştır. Mayanın yaşlanmasının hücre içi bakterilerin salınımına yol açıp açmayacağını araştırmak için, BHI agar üzerindeki mide ve gıda kaynaklı 20 maya kültürü, oda sıcaklığında kapalı bir nemli

bölmeler içerisinde tutulmuştur ve bakteri büyümesi açısından haftalık olarak incelenmiştir. 20 mayanın 3-4 haftalık kültüründen yalnızca 1'inde (Y1) salınan bakterilerde aşırı büyüme görülmüştür. Açlıktan ölmüş mayadan bakteri salınımını araştırmak için, her mide veya gıda kaynaklı mayanın taze kültüründen iki koloni alınıp, 5 mL steril distile su içeren cryo tüpe aşılantıdır. Tüplerin oda sıcaklığında 7 gün inkübasyonundan sonra, 50 µL distile su içerisinde bulunan kültürler, BHI agar petrilere spotlama şeklinde inoküle edilmiştir ve 30 ° C'de inkübe edilmiştir. Petriler bakteri kolonilerinin büyümesinin kontrolü için günlük olarak incelenmiştir. 20 mayadan 3'ünün (Y3, Y13 ve Y18), üzerinde bakteriyel kolonilerin oluşumu gözlenmiştir. Uzun süre inkübe edilen 20 mayadan bir yaşlı maya (Y1), yaklaşık 4 hafta sonra bakteri salınımını (B1) gerçekleştirmiştir. 20 besinsiz bırakılan mayanın üçünden (Y3, Y13 ve Y18) bakterilerin salındığı tespit edilmiştir. 4 maya (Y1(gastrik), Y3(gastrik), Y13(gıda) ve Y18(gıda)) kültüründen salınan bakteriler gözlenmiştir. Salınan bakteriler (B1, B3, B13 ve B18) izole edilmiştir ve biyokimyasal özellikleri belirlenmiş ve 16S rDNA gen bölgesinin amplifikasyonu ile cins düzeyinde tanımlanmıştır. *Candida albicans*'tan salınan bakteri *Arthrobacter*, *Candida tropicalis*'den salınan bakteri *Staphylococcus*, *Saccharomyces cerevisiae*'dan salınan bakteri *Cellulomonas*, *Candida glabrata*'dan salınan bakteri *Staphylococcus* genusuna aittir (Heydari vd., 2020b). Normal koşullar altında maya, hücre içi bakterilerin çoğalmasını kontrol etmektedir. Bununla birlikte, yaşlanma ve açlık olduğu durumda kontrol sağlayamazlar ve bakterilerin aşırı büyümesi meydana gelmektedir. Salınan bakterilerin sınırsız çoğalmasıyla, bakteriler maya için besin kaynağı olarak kullanılmaktadırlar. Maya ve bakteri arasında her iki partnerin de hayatta kalmasını sağlayan evrimsel bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma mayaların hücre içinde barındırdığı endofungal bakterilerini yaşlanma ve açlık stresi altında dışarıya salabileceğini göstermektedir (Heydari vd., 2020b). *Arthrobacter* ve *Cellulomonas* türlerinin maya litik enzimleri üretebilme yeteneğinin olduğu bilinmektedir. *S. xylosus* ve *S. haemolyticus* gibi koagülaz negatif stafilokoklar, lipazlar, proteazlar, esterazlar ve fosfolipazlar gibi ekstraselüler proteinler ve enzimler ile hemolizinler ve diğer toksinleri üretme potansiyeline sahiptir. B1 kodlu *Arthrobacter* izolatu jelatin ve nişastanın hidrolizi, B3 kodlu *Staphylococcus* izolatu jelatin ve üre

hidrolizi, B13 kodlu *Cellulomonas* izolatı nişasta hidrolizi ve B18 kodlu *Staphylococcus* izolatı hemoliz aktivitesi göstermiştir.

Bakterilerin, mayanın hücre duvarını tahrip eden glukanzlara sahip olduğu daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Bu raporların sonuçları, bakterilerin mayalara karşı kendilerini korumak, maya hücrelerinin içine girmek veya mayalarla beslenmek için maya hücresini parçalamayı öğrendiklerini göstermektedir (Heydari vd., 2020). *H. pylori*'nin de diğer bakteriler gibi maya hücre duvarını parçalayacak enzimleri üretilip üretilmediği araştırılmalıdır. Mayaların glukanzları esas olarak hücre duvarı büyümesi ve tomurcuklanma için kullandıkları bilinmektedir. Ancak bu enzimlerin sentezinin ve aktivitesinin fungusların yaşam döngüsünde nasıl düzenlendiği net değildir. Kültür ortamının türü, pH, sıcaklık, havalandırma ve büyüme fazı gibi çevresel faktörlerin glukanzların biyosentezini ve aktivitesini etkileyebileceği görülmektedir. Bu enzimler, funguslar veya bakteriler glikoz varlığında hızla büyüdüğünde belirgin şekilde baskılanmaktadır. Bununla birlikte, glikoz açlığı altında glukanzlar önemli miktarlarda üretilmektedir ve bu da fungal otolize yol açmaktadır. Otoliz, beslenme yetersizliği olduğunda yaşlı fungusların hiflerinde de meydana gelmektedir. Bu bulgular, fungal glukanzların yaşlanma ve açlık stresleri altında aktivasyonunun, maya hücre duvarının parçalanması ve bakterilerin salınmasında rol oynayabileceğini göstermektedir (White vd., 2002). Fakat fungal glukanzların kaynağıyla ilgili bilgiler hala yetersizdir. Gelecekteki çalışmaların, glukanzların fungusa ait olup olmadığını veya endofungal bakterilerden kaynaklanıp kaynaklanmadığını açıklığa kavuşturması beklenmektedir.

Mayanın amfoterisin B antifungal ajanı ile muamelesi, fungal vakuolar ve sitoplazmik membranların tahrip olmasına ve glukanzlar gibi hidrolitik enzimlerin salınmasına ve son olarak maya hücresinin lizisine yol açabilmektedir. Tavakolian ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı bir çalışmada mideden, ağızdan izole ettikleri *Candida* mayalarını amfoterisin B (amph B) ile muamele etmişlerdir. Kullanılan antifungal fungal plazma membranının ve vakuol membranının bütünlüğünü bozmaktadır. Antifungal ile muameleden sonra bakteri salınımı gerçekleştirip

gerçekleştirmedeği incelenmiştir (Tavakolian vd., 2018). Her maya izolatu için, farklı konsantrasyonlarda amph B içeren büyüme ortamlarına maya süspansiyonları aşılanmıştır. Deneme sonucunda 2 maya izolatının dışarıya bakteriyi saldıgı gözlenmiştir. Bulanıklılık olan tüplerden alınan örneklerden gram boyama yapılmış ve preparatlar mikroskopik olarak incelenmiştir. İnceleme sonucunda saf gram pozitif kok hücreleri gözlenmiştir. Aynı zamanda bulanıklılık gözlenen tüplerden içerisinde Brain Heart Infusion Agar bulunan petrilere ekim yapıldığında da saf koloniler elde edilmiştir. Çalışmada amph B ile muamele edilmiş 50 *Candida* izolatının 2'sinden bakteriler saf olarak elde edilmiştir. Bu bakteriler *Staphylococcus hominis* (B1) ve *S. haemolyticus* (B2) olarak tanılanmıştır. Çalışmada ayrıca direkt mayadan izole edilen total DNA hem *Staphylococcus*'a özgü tuf geni spesifik primerler ile hem de *H. pylori* spesifik primerler ile amplifikasyona tabi tutulmuştur. Sonuç olarak 50 *Candida* izolatının 14'ünde hem tuf geni spesifik ürünler hem de *H. pylori* spesifik ürünler saptanmıştır. 12' sinde 2 gen de saptanmamıştır. 6'sında sadece *H. pylori* spesifik ürünler 18'inde ise sadece tuf spesifik ürünler elde edilmiştir. Çalışmada 50 *Candida* izolatının sadece 2'sinden bakteriler salınmış ve kültüre edilebilmiştir. *H. pylori* kültüre edilememiştir (Tavakolian vd., 2018).

Bertaux ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, daha önce bakteri kontaminasyonu olmayan *Laccaria bicolor*'un fermentör kültürlerinde bakteri çoğaldığı görülmüştür, bu da bakterilerin hücre içinde bulunabileceğini göstermektedir. Bakteriler, laboratuvar ortamında kültüre edilmiş ve 16S rDNA gen bölgesinin amplifikasyonu ardından sekanslanmasıyla, *Paenibacillus* spp. olarak tanımlanmıştır. Bakterilerin fungal hiflerdeki hücre içi lokalizasyonu FISH ve konfokal lazer tarama mikroskobu ile gösterilmiş, ancak bakteri salınım mekanizmaları araştırılmamıştır. Buna göre, fungus hücresinden bakteriyel salınım, ilaçlara veya diğer bilinmeyen faktörlere maruz kalarak hücre duvarının parçalanması nedeniyle gerçekleşebilir. Burada, glukanaazlar ana oyuncular olarak görünmektedir (Bertaux vd., 2005). Salınan bakterilerin tanımlanması, her bir mayadan yalnızca bir bakteri türünün salındığını göstermiştir. Mayalardan salınan birden fazla bakteri türünün olabileceği unutulmamalıdır. Bununla birlikte, bazı

endofungal bakterilerin kültüre edilmesi için gerekli olan uygun büyüme ortamı ve atmosferik koşullar hakkında bilgi eksikliği sebebiyle saptanamamaktadırlar. Bir maya hücresinde birkaç vakuolün bulunması, her vakuolün bir bakteri türü için özel bir niş görevi görebileceğini göstermektedir. Fakat bir vakuol içinde birden fazla bakteri hücresinin bulunması, tek bir vakuolde benzer veya farklı bakteri türlerinin aynı anda bulunabileceğini işaret etmektedir. Mayadaki endofungal bakterilerin çeşitliliği hakkında genel bir bilgi yoktur. Çok çeşitli nişlerde maya ve bakterilerin ortaya çıkması, evrimsel süre boyunca evrimleşmiş olabilecek yakın ilişkilerini ifade etmektedir, ancak bu eski ilişkinin ayrıntıları ve önemi hala açıklığa kavuşmamıştır (Mille-Lindblom ve Tranvik, 2003; Shirtliff vd., 2009; Tarkka vd., 2009). Bununla birlikte, son araştırmalar, bu ilişkinin çok daha derinlere gittiğini ve fungal vakuolün içindeki bakteriyel endosimbiyoz olduğunu göstermektedir (Bonfante ve Desirò, 2017; Siavoshi ve Saniee, 2014). Ökaryotlarla endosimbiyotik ilişkide, bakteriler, farklı kompleks besinleri sindirerek, konukçularının rakiplerine karşı gelmesine veya belirli bir yaşam tarzı oluşturmaya yardımcı olabilmektedir. Buna göre, çok işlevli prokaryotları endosimbiyontlar olarak kullanmak, ökaryotların evrimi için mutlak bir gerekliliktir. Mitokondri ve kloroplastın inovasyonu, ökaryotik hücrelerdeki bakteriyel endosimbiyozun en önemli sonucudur (Dyall ve Johnson, 2000; Scherlach vd., 2013). Maya gibi tek hücreli ökaryotların, çeşitli türlerde organelleri barındırmak yerine, çeşitli faaliyetler için bir veya daha fazla endofungal bakteriyi kullandığı ileri sürülmektedir. Endofungal bakteriler, maya için hayati aktiviteleri kodlayan bir genetik depo görevi görebilir. Birkaç çalışmanın sonuçları, ökaryotik genlerin bazılarının prokaryotik kökene sahip olduğunu ve endofungal bakterilerden elde edildiğini göstermektedir. Fungusların genomik haritasındaki endobakteriyel genlerin tespiti, bakterilerin funguslarla endofungal birlikteliğini işaret etmektedir. Endofungal bakteriler, fungusların farklı nişlere adapte olmasına katkıda bulunabilmektedir. Buna karşılık, fungal konukçu endofungal bakteriler için çevresel bir rezervuar görevi görebilmektedir (Keeling ve Palmer, 2008; Soucy vd., 2015; Spraker vd., 2016; Uehling vd., 2017; Deveau vd., 2018).

Endofungal ilişkilerde, endofungal bakteri yükü, konukçunun kontrolü altındadır. Çünkü endofungal bakterinin kontrolsüz çoğalması, konukçunun ölümüne yol açmaktadır. Endofungal bakteri replikasyonunu kontrol eden konukçu genlerinin, konukçu metabolik olarak aktif olduğunda ve glikoz gibi besinlerin varlığında normal olarak büyüdüğü zaman yüksek oranda eksprese edildiği ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, besin açlığı meydana geldiğinde, aktif metabolizmaya dahil olan genler ve endofungal bakterinin replikasyonunu engelleyen genler kapatılır ve bu da endobakteriyel salgın ve büyümeye neden olmaktadır. Fungal hücre duvarı ve zarı, bakterilerin çıkış yolunu bulabildikleri zayıf noktalardır (Lowe vd., 2016).

Maya hücresinin dışarıya saldırdığı bakterinin herhangi bir sınırlama olmaksızın çoğalması, yakın çevredeki hücrelere bol miktarda besin sağlamaktadır. Bu durum bakteri ve fungus arasındaki karşılıklı yararlı ilişkiyi gösteren evrimsel bir fenomen olabilir. Sonuçta, her iki mikroorganizmanın da hayatta kalması, çoğalması ve dünyadaki diğer organizmalar tarafından işgal edilmesi mümkün olmayan nişleri işgal edebilme konusunda avantaj sağlayacaktır. Bu şekilde maya; maya konukçusu içindeyken esir olarak ve salındığında besin olarak hizmet eden bakterileri hayatta kalmak için toplamaktadır. Hücre içi bakterilerin replikasyonu ve salgını üzerindeki fungal kontrol, bakteri ve fungus arasında çözülmeyi bekleyen gizli şifreyi içermektedir (Heydari vd., 2020).

Heydari ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptığı bir çalışmada maya içinde bakteri bulunuşunu tespit etmek için marker olarak Peptidoglikanı (PG) hedeflemişlerdir. Eski ve yeni nesil mayalarda sadece birkaç bakterinin saptanması, mayanın hücre içi bakteri bolluğunu nasıl kontrol ettiği sorusunu gündeme getirmiştir. *H. pylori*'ye özgü 16S rDNA ve *Staphylococcus*'a özgü 16S rDNA'nın birlikte bulunduğu bir gastrik *C. tropicalis*, hücre içi bakterilerin canlılığını değerlendirmek için boyanmıştır. Floresin izotiyosiyanat (FITC) etiketli anti-PG monoklonal antikoru (APGMAB), maya içindeki PG'nin doğrudan immüno-flüoresan teknik ile saptanması için kullanılmıştır. APGMAB kaplı manyetik boncuklar, bakterilerin parçalanmış mayalardan ayrılması için kullanılmıştır.

Boncuk bağı bakteriler ayrılmış, sabitlenmiş, boyanmış ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Boncuğa bağı bakteriler kültürlenmiştir ve 16S rDNA'nın amplifikasyonu ve dizilenmesiyle tanımlanmıştır. Floresan mikroskopisi, maya hücrelerinin içinde birkaç canlı bakterinin varlığını göstermiştir. FITC- APGMAB, hücre içi bakterilerin PG'si ile etkileşime girmiştir ve anne ve yavru maya hücrelerinde birkaç yeşil nokta olarak görünmüştür. İlginç bir şekilde, maya hücrelerinin dışında da PG fragmanları tespit edilmiştir. SEM gözlemleri, boncuklara bağı basiller ve kokların ayrıldığını göstermiştir. Stafilokoklar kültüre edilebilmesine rağmen *H. pylori* kültüre edilememiştir. Sekans analizi sonucunda , ayrılan bakteriler *H. pylori* ve *Staphylococcus* olarak tanımlanmıştır. Maya içinde tespit edilen PG; *H. pylori*, *Staphylococcus* veya mayada mikrobiyom olarak bir arada bulunan diğer herhangi bir hücre içi bakteriye ait olabileceği düşünülmektedir. Eski ve yeni nesil mayalarda sadece birkaç hücre içi bakterinin ve bunların dış kısımlarında PG fragmanlarının saptanması; mayanın, hidroliz ve PG'nin dışa aktarımı aracılığıyla hücre içi bakteri bolluğunu düşük oranda kontrol ettiğini göstermiştir. (Heydari vd., 2022).

Konu ile ilgili yapılan literatür çalışmaları sonucunda endofungal bakterilerin *Candida* mayalarının vakuollerinin içerisine gizlenerek hayatta kalmaya devam ettiği ve antibiyotikler, stresli koşullara karşı direnç gösterdikleri görülmektedir. Maya endofungal bakterileri tıpkı truva atı gibi koruyarak ileriki nesillere aktarılmasını sağlamaktadır. Maya içerisinde sağlık açısından önem taşıyabilecek endofungal bakterilere dair sınırlı sayıda veri bulunmaktadır. Maya içindeki endofungal gelişimin, klinik açıdan önemli *H. pylori* eradikasyonunu önemli ölçüde etkilemektedir. Bu bilgiler ışığında midenin antrum ve korpus bölgelerinden alınan mide biyopsi örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinde *H. pylori* varlığı araştırılmıştır. Böylece çalışma sayesinde maya içerisindeki endofungal birlikteliklerle ilgili verilere katkı sağlamak ve *H. pylori* kaynaklı hastalıkların tekrarlamasını önlemek amacıyla bakteriyle savaşmanın yanında içerisinde bakteri barındıran maya ile savaşmanın da hastalığın tekrarlaması açısından önemli olduğuna dikkat çekmek amaçlanmıştır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereçler

3.1.1 Çalışma materyalleri:

Bu çalışmada çeşitli şikayetleri nedeniyle Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji kliniğine başvuran ve takip eden hekimi tarafından tıbbi açıdan özofagogastroduodenoskopi (ÖGD; Üst GİS Endoskopisi) işlem endikasyonu konulan hastalarla işlem öncesi görüşülerek çalışma ekibinde görevli hekim tarafından çalışmayla ilgili bilgilendirme yapılmıştır. Hali hazırda tıbbi gereklilik nedeniyle hastaya yapılacak işlem öncesi gönüllülük esası ile hastalardan bilgilendirilmiş onam formu alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya 18 yaş üstü, çalışmaya katılmaya gönüllü olan tüm hastalar dahil edilmiştir. Çalışmaya alınan her hasta için olgu rapor formu doldurulmuştur. ÖGD işlemi esnasında endoskopik yolla rutin prosedürleri için alınan mide biyopsilerine ek olarak 1 adet milimetrik mide biyopsi örneği çalışmada kullanılmak üzere alınmıştır. Dışlama kriterleri; ÖGD yapılan ancak çeşitli sebeplerden işlem esnasında biyopsi yapılması uygun görülmeyen (Siroz hastalığına bağlı kanama diyatezi, işlem esnasında aktif kanama vs gibi), ya da işlem esnasında mideye ulaşamayan (özofagus darlığı gibi) hastalar çalışmadan dışlanmıştır.

Örnek alınacak her bir birey için yaş, cinsiyet, eğitim düzeyi, alkol kullanımı, sigara kullanımı, beslenme alışkanlıkları, antibiyotik kullanımı, genel sağlık durumları, varsa daha önce ameliyat geçirip geçirmediği, Hp tedavisi alıp almadığı, protez diş kullanıp kullanmadığı gibi soruları kapsayan Ek1'deki olgu rapor formu doldurulmuştur. Projenin gerçekleştirilebilmesi için Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Araştırmalar Etik Kurul'undan 25.06.2021 tarihli, 21-6.1T/21 no'lu karar ile onay alınmıştır (Ek 1).

3.1.1.1 Mide biyopsi örnekleri:

Çalışmaya alınacak hasta sayısı power analizle %95 güven aralığında ve %80 güç oranında 233 hasta olarak belirlenmiştir. Örnekler Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji kliniğine başvuran ve takip eden hekimi tarafından tıbbi açıdan özofagogastroduodenoskopi (ÖGD) işlem endikasyonu konulan hastaların midelerinin antrum ve korpus bölgelerinden alınmıştır.



Şekil 3.1. Özofagogastroduodenoskopi (ÖGD) İşlemi esnasında endoskopik yolla mide biyopsi örneklerinin alınması

3.1.1.2 Besiyerleri:

Besiyeri 1. Brain Heart Infusion Broth (Beyin Kalp İnfüzyon Broth (BHI)) (NEOGEN-NCM0016A)

Brain heart infusion 27,5 gr/lt

D(+) Glikoz 2,0 gr/lt

NaCl5,0 gr/lt

Na₂HPO₄2,5 gr/lt

Distile su1000 ml

Üretici firmanın talimatına göre hazır besiyerinden 37,0 gr alınıp besiyeri 1000 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Çözülen besiyeri her tüpte 5 ml olacak şekilde cam tüplere paylaştırılmıştır. Ardından tüpler 121°C’de 1,1 atm basınçta 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır. İçerisinde steril 5 ml BHI Broth besiyeri bulunan tüplere mide biyopsi örnekleri alınmıştır ve tüpler mide biyopsi örneklerinin aynı gün içerisinde analize alınmak üzere laboratuvara taşınmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 2. Brain Heart Infusion Agar (BHA)

Brain heart infusion 27,5 gr/lt

D(+) Glikoz 2,0 gr/lt

NaCl5,0 gr/lt

Na₂HPO₄2,5 gr/lt

Agar15,0 gr/lt

Distile su1000 ml

Brain Heart Infusion Agar, BHI broth içerisinde agar eklenerek hazırlanmıştır. BHA içerisine %10 insan kanı ilave edilerek kullanılmıştır. BHA besiyeri gerekli miktarda tartılıp 121°C’de 1,1 atm basınçta 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan sonra yeteri kadar soğuyan besiyerine %10 oranında insan kanı eklenmiş ve besiyeri steril petrilere paylaştırılmıştır. %10 insan kanı ilave edilmiş BHA, *Candida* spp. içerisinde endofungal *H. pylori* suşlarının GasPack Jar içerisinde mikroaerofilik koşullar altında kültüre edilme çalışmalarında kullanılmıştır.

Besiyeri 3. Brucella Agar (BA) (LIOFILCHEM-610079)

Peptone from meat 10,0 gr/lt

Peptone from casein 10,0 gr/lt

Yeast extract 2,0 gr/lt

D(+) Glucose 1,0 gr/lt

NaCl 5,0 gr/lt

Agar 13,0 gr/lt

Distile su 1000 ml

Üreticinin talimatları doğrultusunda gerekli miktarda tartılan besiyeri 121°C’de 1.1 atm basınçta 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. *Candida* spp. içerisinde endofungal *H. pylori* suşlarının GasPack Jar içerisinde mikroaerofilik koşullar altında kültüre etme çalışmalarında kullanılmıştır.

Besiyeri 4. Kan Agar (KA) (LIOFILCHEM-610005)

Heart extract and peptones 20,0 gr/lt

NaCl5,0 gr/lt

Agar15,0 gr/lt

Distile su1000 ml

Kan Agar besiyeri içerisine %10 insan kanı ilave edilerek kullanılmıştır. Üreticinin talimatları doğrultusunda gerekli miktarda tartılan besiyeri 121°C’de 1,1 atm basınçta 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan sonra yeteri kadar soğuyan besiyerine %10 oranında insan kanı eklenmiş ve besiyeri steril petrilere paylaştırılmıştır. % 10 insan kanı ilave edilmiş BA besiyeri, *Candida spp.* içerisinde endofungal *H. pylori* suşlarının GasPack Jar içerisinde mikroaerofilik koşullar altında kültüre etme çalışmalarında kullanılmıştır.

Besiyeri 5. Harlequin® Candida Chromogenic Agar (NEOGEN-NCM1012)

Glucose 20,0 gr/lt

Peptone 10,0 gr/lt

Chromogenic Substrate 0,40 gr/lt

Chloramphenicol0,50 gr/lt

Agar15,0 gr/lt

Distile su 1000 ml

Üreticinin talimatları doğrultusunda gerekli miktarda tartılan besiyeri mikrodalga fırında kaynatılarak kullanıma hazır hale gelmiştir. Besiyeri mide biyopsi örneklerinden *Candida spp.* izolasyonunda kullanılmıştır.

Besiyeri 6. Malt Yeast Glukoz Peptone Broth/Agar (MYGP-B/MYGP-A)

Malt ekstrakt (MERCK, 105391).....	3 gr
Yeast ekstrakt (MERCK,103753).....	3 gr
Pepton (MERCK, 107214).....	5 gr
Glukoz (SIGMA, SZBA3420V).....	10 gr
Agar (MERCK, 101613).....	20 gr
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği 1000 ml suda çözülerek otoklavda 121°C’de, 1,1 atm basınçta, 15 dak. süre ile steril edilmiştir. Malt Yeast Glukoz Pepton Broth besiyerine agar ilave edilmeden hazırlanmaktadır. Malt Yeast Glukoz Pepton Agar *Candida* spp. ait saf kültürlerin stoklanması ve Malt Yeast Glukoz Pepton Broth ise DNA izolasyonu için gerekli hücre yığınının eldesinde kullanılmıştır. Ayrıca mideden *Candida* spp. izolasyonu eş zamanlı olarak hem MYGP-A hem de Chromagar’da gerçekleştirilmiştir.

Besiyeri 7. Üre Agar (LAB M)

Üre	20 gr
Sodium chloride	5 gr
Monopotassium phosphate ..	2 gr
Glucose	1 gr
Dextrose	1 gr
Phenol red	0,012 gr

29 gr besiyeri içeriği 100 ml suda çözülmüştür ve filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. 900 ml'lik BHI-A hazırlanarak otoklavda 121°C'de, 1,1 atm basınçta, 15 dak. süre ile steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminin ardından steril 100 ml üre ortamı steril BHI-A besiyeri içerisine eklenmiştir. *H. pylori* ortamdaki üreyi kullandığında ortamı alkali hale getirerek amonyak oluşturmaktadır. *H. pylori* kültürleme çalışmalarında kullanılmıştır.

3.1.1.3 Tamponlar, boyalar ve çözeltiler:

Çalışmamızın çeşitli aşamalarında kullanılan çözelti, boyalar ve diğer kimyasallar aşağıda verilmiştir.

Basit boyamada kullanılan boyalar:

Kristal viyoleto boyası: 20 ml %95'lik etanolde 2,0 gr kristal violet çözülmüştür. 80 ml distile suda 0,8 gr amonyum oksalat çözülmüş ve bu çözelti alkolde çözülmüş olan kristal violet solüsyonuna ilave edilmiştir. İzole edilen mayaların boyanmasında kullanılmıştır.

Floresan in situ hibridizasyon analizinde kullanılan çözeltiler ve probalar:

1.Phosphate Saline Buffer (PBS) tamponu:

NaCl 0,8 gr

KCl0,02 gr

Na₂HPO₄ 0,142 gr

KH₂PO₄ 0,024 gr

Distile su 100 ml

FISH analizinde maya hücrelerini yıkama amaçlı kullanılmıştır. Tüm bileşenler gerekli miktarlarda tartılıp distile su içerisinde çözülmüştür. 121 °C’de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir.

2.Wash Buffer tamponu (100 ml):

20 mM Tris/HCl (SIGMA)..... 0,3152 gr

100 mM NaCl 0,585 gr

FISH analizinde ve *Candida* içerisinde endofungal *H. pylori* suşlarını kültüre etme çalışmalarında kullanılmıştır. Tüm bileşenler gerekli miktarda tartılıp filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

3.FISH Buffer (5M NaCl, 1M Tris-HCl, %10 SDS, %37.7 Formamide)(100ml):

NaCl18,22 gr

Tris-HCl (SIGMA).....9,8 gr

SDS (Glentham,163ZSS) ...6,22 gr

Formamide (MERCK)..... 37,7 ml

Distile su 62,3 ml

H. pylori’ye özgü Hpy probu (5’-CACACCTGACTGACTATCCCG-3’) kullanılarak gerçekleştirilecek FISH analizinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Tüm bileşenler gerekli miktarda tartılıp 62,3 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Ardından 121 °C’de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra 37,7 ml formamide solüsyonu eklenmiştir. Tampon – 20 °C’de karanlıkta saklanmıştır.

4.FISH Buffer (5M NaCl, 1M Tris-HCl, %10 Formamide)(100ml):

NaCl26,32 gr

Tris-HCl (SIGMA).....14,18 gr

Formamide (MERCK)....10 ml

Distile su 90 ml

Bakterilere özgü EUB 338 probu (5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3') kullanılarak gerçekleştirilecek FISH analizinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Tüm bileşenler gerekli miktarda tartılıp 90 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Ardından 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra 10 ml formamide solüsyonu eklenmiştir. Tampon – 20 °C'de karanlıkta saklanmıştır.

5.FISH Buffer (5M NaCl, 1M Tris-HCl, %20 Formamide)(100ml):

NaCl 23.4 gr

Tris-HCl (SIGMA).....12.60 gr

Formamide (MERCK).....20 ml

Distile su 80 ml

Bakterilere özgü EUB 338 probu (5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3') kullanılarak gerçekleştirilecek FISH analizinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Tüm bileşenler gerekli miktarda tartılıp 80 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Ardından 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra 20 ml formamide solüsyonu eklenmiştir. Tampon – 20 °C'de karanlıkta saklanmıştır.

6.FISH Buffer (5M NaCl, 1M Tris-HCl, %30 Formamide)(100ml):

NaCl 20.,475 gr

Tris-HCl (SIGMA)..... 11,032 gr

Formamide 30 ml

Distile su 70 ml

Bakterilere özgü EUB 338 probu (5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3') kullanılarak gerçekleştirilecek FISH analizinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Tüm bileşenler gerekli miktarda tartılıp 70 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Ardından 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra 30 ml formamide solüsyonu eklenmiştir. Tampon – 20 °C'de karanlıkta saklanmıştır.

7.EUB 338 prob (OLİGOMER):

Bakteriyel 16S rRNA'ya özgü EUB 338 (5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3) probu maya içerisinde yaşayan bakterileri saptamak amacıyla FISH analizinde kullanılmıştır.

8.Non-EUB 338 prob (OLİGOMER):

Non-spesifik bağlanmayı tespit etmek amacıyla kullanılmıştır.

9.Hpy prob (OLİGOMER):

H. pylori'ye özgü Hpy 5'-(CACACCTGACTGACTATCCCG)-3' probu maya içerisinde yaşayan *H. pylori*'leri saptamak amacıyla FISH analizinde kullanılmıştır.

DNA izolasyonunda kullanılacak tamponlar ve çözeltiler:

Lizis Tamponu (pH 8):

400 mM Tris HCl (SIGMA)..... 6,3 gr

60 mM EDTA (Glenthams,226JXM).....2,35 gr

150 mM NaCl 0,9 gr

%1'lik SDS (Glenthams,163ZSS)..... 1,0 gr

Distile su 100 ml

Candida spp. izolatlarından DNA izolasyonu sırasında kullanılmıştır. Tüm bileşenler gerekli miktarlarda tartılıp distile su içerisinde çözülmüştür. 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan çözeltinin pH'sı kontrol edilmiş ve kullanıma hazır hale gelmiştir.

Potasyum Asetat Tamponu:

5M Potasyum asetat (SIGMA, SLBR2628V)..... 14,7 gr

Glasiyel asetik asit 5,75 ml

Distile su 29,55 ml

Candida spp. izolatlarından DNA izolasyonu sırasında kullanılmıştır 14,7 gr potasyum asetat 29,55 ml distile su içinde çözülmüş ve otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıktıktan sonra 5,75 ml glasiyel asetik asit eklenmiştir.

Tris Borik Asit EDTA (TBE) Tamponu (5X):

Tris base (Glenthams, 103QGF)10,8 gr

Borik asit (J.T.Baker)..... 5,5 gr

EDTA (Glenthams, 226JXM)..... 0,75 gr

Distile su182,55 ml

Çalışma solüsyonu, total DNA'ların ve PCR ürünlerinin elektroforezinde kullanılan agaroz jelin hazırlanmasında ve yürütme tankının doldurulmasında kullanılmıştır. 1x çalışma solüsyonu 5x stok solüsyon 1/5 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

İzopropanol:

Candida spp. izolatlarından DNA izolasyonu sırasında kullanılmıştır.

Etanol (%70)

Etanol 70 ml

Distile su 30 ml

Candida spp. izolatlarından DNA izolasyonu sırasında kullanılmıştır.

PCR işlemleri sırasında kullanılacak bileşenler:

- dNTP karışımı (Thermo Fisher Scientific;10 mM):

Her bir deoksinükleotidtrifosfattan 10mM içeren çözelti PCR işlemleri sırasında kullanılmıştır.

- Taq DNA polimeraz(Thermo Fisher Scientific, 500 U):

PCR işlemleri sırasında kullanılmıştır.

- PCR reaksiyon buffer (Thermo Fisher Scientific, 10X):

PCR işlemleri sırasında kullanılmıştır.

- MgCl₂ solüsyonu (Thermo Fisher Scientific, 25 mM):

PCR işlemleri sırasında kullanılmıştır.

- **Ultrasaf su (EAU-BI-DISTILLEE):**

PCR işlemi sırasında ve DNA izolasyonunun son aşaması olan etanolün uçurulmasından sonra DNA süspansiyonu hazırlamak için kullanılmıştır.

- **Primerler:**

Primer Hedef Bölge	Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')
<i>H. pylori</i> 16S rDNA gen bölgesi	HP1	5'-GCAATCAGCGTCAGTAATGTTC-3'
	HP2	5'-GCTAAGAGATCAGCCTATGTCC-3'
<i>H. pylori</i> vacA s1/s2	VA1-F	5'- ATGGAAATACAACAAACACAC -3'
	VA1-R	5'- CTGCTTGAATGCGCCAAAC -3'
<i>H. pylori</i> vacA m1/m2	VAG-F	5'-CAATCTGTC CAATCAAGCGAG-3'
	VAG-R	5'-GCGTCAAAATAATTCCAAGG-3'
<i>H. pylori</i> ureAB gene	no:1F	5'-AACGAATTCAAAAAGCCGTTAGCGTGAAA-3'
	no:2F	5'-GTTTCCATGGCGCTAAAGCGATGACAAC-3'
	R	5'-GCAGGATCCACGCTAAGATTGTTTAA-3'
Primer Hedef Bölge	Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')
26S rDNA gen bölgesi	NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'
	NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'
	CAL5	5'- TGTGCTCTCTCGGGGGCGGCCG-3'

26S rDNA gen bölgesinin	NL4CAL	5' - AAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAA-3'
D1/D2 bölgesine spesifik olarak dizayn edilen <i>C.albicans</i> spesifik primerler	NL5CAL	5' - AGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAA-3'
ITS1-5.8- ITS2 bölgesi	ITS1	5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
	ITS4	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Primerler PCR işlemleri sırasında kullanılmıştır.

- **Marker DNA'lar (GeneDirex):**

Ticari olarak temin edilen marker DNA'lar; genomik DNA'lar ve PCR ürünleri agaroz jel elektroforezde yürütüldükten sonra uygun boyutta olup olmadığının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

- **Yükleme boyası (THERMO):**

Çalışmamızda Thermo Scientific 6X Orange DNA Loading Dye kullanılmıştır. Solüsyon, elektroforezde jel yükleme tamponu olarak kullanılmıştır. DNA örnekleri ve PCR ürünleri yükleme boyası ile birlikte karıştırılıp kuyucuklara yüklenmiştir.

10 mM Tris-HCl (pH 7.6)

%0,15 orange G

%0,03 xylene

%60 glycerol

60 M EDTA

- **GelRed (BIOTIUM):**

Agaroz jel elektroforezinde UV altında total DNA ve PCR ürünlerinin görüntülenebilmesi için kullanılmıştır.

- **DNA izolasyonu kiti (NORGEN):**

Candida içerisinde endofungal *H. pylori* yoğunluğu az olabileceği ve PCR ile amplifiye edilme olasılığının düşük olacağı düşünülerek DNA izolasyonu eş zamanlı olarak hem manuel hem de NORGEN DNA İzolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Amaç daha saf ve fazla miktarda bakteri DNA'sı elde etmektir.

- **NORGEN DNA İzolasyonu Kit İçeriği**

Lysis Buffer L, Binding Buffer I, Solution WN, Wash Solution A, Elution Buffer B, RNase A, Filter Columns, Spin Columns, Collection Tubes, Elution tubes

10. Gas Pack Jar, Mikroaerofilik Kit, Anaerobik Kit



H. pylori ATCC43504 suşunu kültüre etmek ve *Candida* spp. içerisindeki endofungal *H. pylori* suşlarını kültüre etme çalışmalarında Gas Pack Jar (Merck) kullanılmıştır. Mikroaerofilik kitler ve Anaerobik kitler Gas Pack Jar içerisinde sırasıyla mikroaerofilik ortam ve anaerobik ortam oluşturmak amacıyla kullanılmıştır.

3.1.2 Kullanılan başlıca cihazlar:

Vorteks (Heidolph)

Santrifuj (Hettich)

Otoklav (Hirayama)

Işık Mikroskobu (Olympus CX22)

Steril Kabin

Yatay Elektroforez Tankı (Consort)

Jel Görüntüleme Cihazı (VILBER)

PCR Cihazı (BLUE-RAY, BIOTECH)

Floresan Mikroskobu (ZEISS – OBSERVER Z1)(IYTE)

Isı Bloğu (Stuart-Scientific)

3.1.3 Referans suşlar:

Candida albicans ATCC 10231, *Helicobacter pylori* ATCC 43504

Çalışmada kullanılan *Helicobacter pylori* ATCC 43504 suşu Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yakut Akyön Yılmaz'ın sorumlu olduğu laboratuvardan alınmıştır.

3.1.4 Antifungal duyarlılık testinde kullanılan malzemeler:

İçerisinde endofungal *H. pylori* bulunan *Candida* spp. izolatlarının in vitro antifungal duyarlılık testleri için amfoterisin B ve flukonazol kullanılmıştır. Antifungal duyarlılık testi MIC yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 96 kuyucuklu microplate kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Örneklerin alımı ve laboratuvara getirilmesi:

Örnekler Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji kliniğine başvuran ve takip eden hekimi tarafından tıbbi açıdan özofagogastroduodenoskopi (ÖGD) işlem endikasyonu konulan hastaların midelerinin antrum ve korpus bölgelerinden alınmıştır. 233 hastanın ÖGD işlemi esnasında endoskopik yolla rutin prosedürleri için alınan mide biyopsilerine ek olarak antrum ve korpus bölgelerinden 2'şer adet milimetrik mide biyopsi örneği çalışmada kullanılmak üzere alınmıştır. Mide biyopsi örnekleri içerisinde steril Brain Heart Infusion Broth bulunan tüpler içerisine alınmıştır. Alınan örnekler zaman kaybedilmeden buz kabı içerisinde saklanarak laboratuvara getirilmiştir.

3.2.2 *Candida* spp. izolasyonu:

Mide biyopsi örnekleri içerisinde Brain Heart Infusion Broth (BHI-B) bulunan tüpler içerisine alınmıştır. Her hasta midesinin antrum ve korpus bölgesinden 2 ayrı tüpe biyopsi örneği alınmıştır. Biyopsiler aynı gün içinde laboratuvara getirilip izolasyon işlemlerine başlanmıştır. Mide biyopsi örneklerinden *Candida* izolasyonu için eş zamanlı olarak Malt Yeast Glikoz Pepton Agar (MYGPA) ve Harlequin® *Candida* Chromogenic Agar kullanılmıştır ve dilüsyonlar için paralel ekimler yapılmıştır. 24-48 saat 37°C' de inkübasyona bırakılmıştır. Aynı anda farklı tipte kolonilerin seçilebilmesi için mide biyopsi örneklerini aldığımız ilk tüpten 0,1 ml alınıp Harlequin® *Candida* Chromogenic Agar besiyerine aktararak steril baget ile yüzeye yayılmıştır. Bu besiyerinde gözlenen farklı renk ve büyüklükteki koloniler *Candida* genusu üyelerinin saflaştırılması için uygundur. Ancak Chromogenic ortam içerisinde bulunan antibiyotikten maya içerisindeki bakterilerin etkilenme ihtimaline karşı hem MYGP-A hem de CHROM agardan izole edilen maya izolatları FISH ile incelenmiştir. Ortam içerisinde bulunan antibiyotiğin endofungal bakterilere etki

etmediğinden emin olunmuştur. CHROMagar Candida ortamında gözlenen farklı renk ve büyüklükteki maya kolonileri çizgi ekim yapmak süreti ile saflaştırılmış ve yatık MYGP-A ortamlarına aseptik koşullarda alınarak 37 °C’de 24 saat inkübasyondan sonra stok kültür olarak +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 *Candida* türleri içerisinde endofungal *H. pylori* varlığının araştırılması:

Candida vakuölü içerisinde endofungal *H. pylori* varlığı araştırılacaktır. Bu amaçla Floresan in situ hibridizasyonu (FISH) analizi gerçekleştirilmiştir.

- Floresan in situ Hibridizasyon (FISH)

Candida spp. vakuölü içinde yaşayan endofungal bakteri varlığını araştırmak için bakterilere özgü EUB338 probu ve endofungal *H. pylori* varlığını araştırmak için ise *H.pylori*-spesifik prob (Hpy) kullanılmıştır. İzolasyonda MYGP-A ortamı ile birlikte kullanılan Chromogenic ortam içerisinde bulunan antibiyotikten maya içerisindeki bakterilerin etkilenme ihtimaline karşı hem MYGP-A hem de CHROM agardan izole edilen maya izolatları FISH ile incelenmiştir (Siavoshi vd., 2019).

EUB338 probe kullanılarak gerçekleştirilen FISH analizi

FISH analizi Siavoshi ve arkadaşlarının kullandığı yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Siavoshi vd., 2019).

- **18-24 saatlik *Candida* spp.** kültürü kullanılmıştır.
- Pelletler 3 kez **0.01M Phosphate Buffered Saline (PBS)** içinde yıkanmıştır. PBS maya hücrelerinden besiyeri vb. kalıntıları arındırmak amacıyla kullanılmıştır.

- Ardından yıkanan pelletler, **içine 1µl cy3 etiketli EUB-338 probe eklenen 100 µl FISH hibridizasyon tamponu (5M NaCl, 1M Tris/HCL, %20 Formamide)** içinde yeniden süspanse edilmiştir.

*Yapılan literatür çalışmaları sonucunda, çalışmalarda kullanılan kullanılacak FISH hibridizasyon tamponunun hazırlanışında **farklı formamide** konsantrasyonları kullanıldığı tespit edilmiştir. Bu nedenden dolayı kullanılacak **formamide konsantrasyonunun optimizasyonunu** gerçekleştirilmiştir. FISH hibridizasyon tamponu 3 farklı formamide konsantrasyonunda hazırlanmıştır (5M NaCl, 1M Tris/HCL, **%10 Formamide**; 5M NaCl, 1M Tris/HCL, **%20 Formamide**; 5M NaCl, 1M Tris/HCL, **%30 Formamide**). Hazırlanan tamponlar filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

*Farklı konsantrasyonlarda formamide ile hazırlanan FISH Buffer kullanılarak ayrı ayrı FISH analizi gerçekleştirilmiştir. FISH analizinden sonra floresan mikroskop altında yapılan inceleme sonucunda en iyi ışımının içerisinde %20 oranında formamide bulunan FISH Buffer'ın kullanıldığı deney sonucunda elde edilmiştir. **Optimizasyon sonucunda %20 formamide konsantrasyonun en uygun** olduğu belirlenmiştir ve analizlere formamide konsantrasyonunun %20 olduğu FISH hibridizasyon tamponuyla devam edilmiştir.

- Süspansiyon **37 °C'de** 120-150 rpm'de 1.5-2 saat çalkalamalı inkübatörde karanlıkta inkübe edilmiştir.
- Hibridizasyondan sonra hücreler her seferinde 5 dakika olmak üzere **2 kez PBS** ile ardından **2 kez Wash Buffer** ile yıkanmıştır.
- Yıkanan maya hücreleri **150-200 µl PBS içinde tekrar süspanse** edilmiştir.
- Maya süspansiyonundan preparat hazırlanmıştır.

- Preparatlar İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü BİYOMER analiz merkezinde ZEISS-OBSERVER Z1 floresan mikroskopu altında incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

Non-EUB338 probe kullanılarak gerçekleştirilen FISH analizi

Non-spesifik bağlanmayı tespit etmek için non-EUB338 probe kullanılarak FISH analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz basamakları EUB-338 probe kullanılarak gerçekleştirilen FISH analizinde olduğu gibidir.

***H.pylori*'ye özgü probe (Hpy) kullanılarak gerçekleştirilen FISH analizi**

FISH analizi Siavoshi ve arkadaşlarının kullandığı yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Siavoshi vd., 2019). Hpy-probu kullanarak gerçekleştirilen FISH analizinde kullanılan FISH hibridizasyon tamponundaki **formamide konsantrasyonu %37.5'tur. Hibridizasyon sıcaklığı 46 °C'dir.**

- **18-24 saatlik *Candida spp.* kültürü** kullanılmıştır.

Pelletler 3 kez 0.01M Phosphate Buffered Saline (PBS) içinde yıkanmıştır. PBS maya hücrelerinden besiyeri vb. kalıntıları arındırmak amacıyla kullanılmıştır.

- Ardındanyıkanan pelletler, içine 1µl cy3 etiketli Hpy prob eklenen 100 µl FISH hibridizasyon tamponu (5M NaCl, 1M Tris/HCL, %37,5 Formamide) içinde yeniden süspanse edilmiştir.

- Süspansiyon 46 °C'de 120-150 rpm'de 1.5-2 saat çalkalamalı inkübatörde karanlıkta inkübe edilmiştir.

- Hibridizasyondan sonra hücreler her seferinde 5 dakika olmak üzere 2 kez PBS ile ardından 2 kez Wash Buffer ile yıkanmıştır.

- Yıkanan maya hücreleri 150-200 µl PBS içinde tekrar süspanse edilmiştir.

- Maya süspansiyonundan preparat hazırlanmıştır.

- Preparatlar İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü BİYOMER analiz merkezinde ZEISS-OBSERVER Z1 floresan mikroskobu altında incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.



FISH DENEYİ



24 saatlik *Candida* spp. kültürü steril kabin içerisinde steril mikrosantrifüj tüpleri içine toplanmıştır.



Maya hücreleri üstüne steril PBS (phosphate saline buffer) eklenmiş ve hücreler yıkanmıştır (x3)



PBS eklenen tüpler santrifüj edilmiştir. Bu aşamadaki amaç hücrelerden besiyeri artıklarını uzaklaştırmak ve temiz hücre



Maya hücreleri FISH buffer ve Hpy-probe ile süspanse edilmiş, tüpler vortekslenmiştir. (eş zamanlı olarak aynı işlem EUB338 probe içinde ayrı tüp içerisinde gerçekleştirildi)

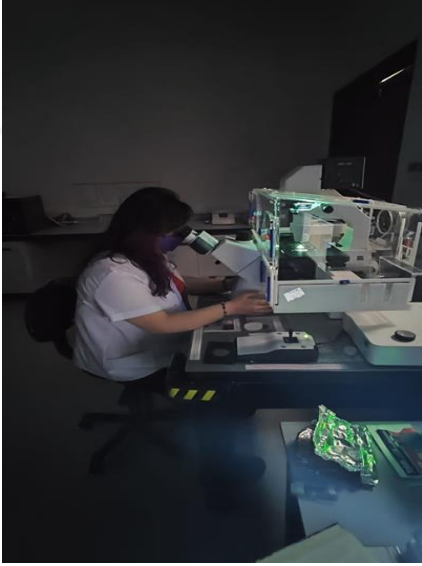




Hibridizasyon çalkalamalı inkübatörde, **46°C**'de 120 rpm'de 2 saat boyunca karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. (EUB338 probe için **37 °C**'de)

Gerekli süre geçtikten sonra yeniden PBS İle yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir ve floresan mikroskobu altında incelemek üzere preparat hazırlanmıştır.





Preparatlar floresan mikroskobu altında
incelenmiştir.

3.2.4 PCR tabanlı moleküler yöntemler ile *Candida* türleri içerisinde endofungal *H. pylori* varlığının araştırılması:

DNA izolasyonu

FISH analizi sonucunda içerisinde endofungal *H.pylori* barındırdığı tespit edilen *Candida* spp. kültürlerinden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. DNA, 3 kez alt kültürü yapılmış *Candida* kültürlerinden ekstrakte edilmiştir. *Candida* spp. izolatlarından DNA ekstraksiyonu Liu ve ark.'larının (2000) geliştirdikleri yöntem daha temiz ve parlak bantlar elde etmek amacıyla üzerinde bazı değişiklikler uygulanarak yapılmıştır. *Candida* içerisinde endofungal *H. pylori* bakteri yoğunluğu az olabileceği ve PCR ile amplifiye edilme olasılığının düşük olacağı düşünülerek DNA izolasyonu hem manuel hem de kit kullanılarak yapılmıştır. Amaç daha saf ve fazla miktarda bakteri DNA' sını elde etmektir. Ayrıca DNA, *H. pylori* ATCC 43504 (pozitif kontrol) ve içerisinde hücre-içi bakteri bulunmadığını bilinen *C. albicans* ATCC 10231 (negatif kontrol) saf kültürlerinden de ekstrakte edilmiştir (Liu vd., 2010).

• Manuel Yöntem İle Gerçekleştirilen DNA İzolasyon Basamakları

- FISH analizi sonucunda içerisinde endofungal *H. pylori* tespit edilen *Candida* spp. izolatları MYGP-A ortamına inoküle edilmiştir ve petriler 24-48 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon süresinin ardından maya hücreleri içerisinde steril distile su bulunan ependorflar içerisine alınmış, pellet yıkaması gerçekleştirilmiştir.
- Yıkanan maya pelleti üzerine 500 µl lizis solüsyonu ilave edilmiştir ve mikrosantrifüj tüpü vorteks ile 5 saniye kadar karıştırılmıştır.
- Mikrosantrifüj tüpleri 15 dakika boyunca 65°C'lik su banyosunda inkübe edilmiştir.

- İnkübasyonun ardından üzerine 150 µl 5M potasyum asetat çözeltisi eklenerek, pipetle homojenize olana kadar karıştırılmıştır.
- Homojenizasyondan sonra mikrosantrifüj tüpleri 12.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj işleminin ardından süpernatant (500 µl), yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine eşit hacimde (500 µl) izopropanol ilave edilerek tekrar 12.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atılıp dipte kalan çökelti üzerine %70'lik etanol ilave edilmiştir.
- Etanol eklenen mikrosantrifüj tüpleri yeniden 12.000 rpm'de santrifüj edilip, sonrasında etanol dökülerek 65°C'de etanol uçurulduktan sonra üzerine 50 µl ultra saf su eklenerek DNA süspansiyonu yapılmıştır ve genomik DNA -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Liu ve ark., 2000).

• Kiti Kullanılarak Gerçekleştirilen DNA İzolasyonu Basamakları

1.Adım Lizat Hazırlama

- a) Maya pelleti santrifüj tüpüne toplanır. Üstüne 500 µl Lizis Buffer L ve 1 µl RNase A eklenir. Karışım 20 saniye vortekslenir.
- b) Süspansiyon 65 °C'de 10 dk. inkübe edilir. İnkübasyon sırasında santrifüj tüpleri ara sıra ters çevrilerek lizatın 2-3 kez karıştırılması sağlanır.
- c) Santrifüj tüpünün içerisinde bulunan süspansiyona 100 µl Binding Buffer I eklenir ve iyice karıştırılır. Buz üzerinde 5 dk bekletilir.
- d) Temiz Collection tüplerin birine filter column (clear O-ring) yerleştirilir. Buzda bekletilen lizattan filtre üzerine eklenir ve 2 dk boyunca 14.000 rpm'de santrifüj edilir.
- e) Santrifüjden sonra supernatant temiz bir santrifüj tüpüne alınır.
- f) Toplam lizata eşit hacimde %70'lik etanol eklenir ve vortekslenir. (Her 100 µl lizata 100 µl etanol) 2. Adıma geçilir.

2. Adım Binding Column

- a) Temiz Collection tüplerin birine spin column (grey O-ring) yerleştirilir.
- b) Spin column üzerine 650 µl lizat+etanol karışımı eklenir. 10.000 rpm'de 1 dk santrifüjlenir.

Dipteki çökelti atılır ve kolon başka temiz collection tüpe yerleştirilir.

Not: Column iyice kontrol edilir, tüm lizat collection tüpe geçmelidir.

- c) Lizat hacmine bağlı olarak 2b adımı tekrarlanır.

3.Adım Column Wash

- a) Column üzerine 500 µl solüsyon WN eklenir ve 10.000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenir.
- b) Alttaki sıvı atılır ve column başka temiz bir collection tüpe yerleştirilir.
- c) Column üzerine 500 µl Wash Solution A eklenir ve 10.000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenir.
- d) Altta kalan sıvı atılır ve column başka temiz bir collection tüpe yerleştirilir.
- e) 3c ve 3d adımı tekrarlanır.
- f) Filtreyi tamamen kurutmak için column 14.000 rpm'de 2 dk boyunca santrifüj edilir ve collection tüp atılır.

4.Adım DNA Elution

- a) Column kit ile birlikte verilen 1.7 ml'lik elüsyon tüpüne yerleştirilir.
- b) Column üzerine 100 µl Elution Buffer B eklenir ve oda sıcaklığında 1 dk. bekletilir.
- c) 10.000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenir. Column'dan ayrılan hacime dikkat edilir ve tüm hacim ayrılmamışsa 14.000 rpm'de 1 dk. daha santrifüj edilir.

- **Total DNA'ların Görüntülenmesi:**

İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* spp. izolatlarının genomik DNA'larının bütünlükleri agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir. Elektroforezde, tampon olarak Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponu kullanılmıştır ve elektroforez %1'lik agaroz jelde gerçekleştirilmiştir. Yükleme solüsyonu, DNA Loading Dye (80 µl) içerisine 1 µl 10000XGelRed(BIOTIUM) nükleik asit boyası eklenerek hazırlanmıştır. 5 µl DNA solüsyonu ve 2 µl yükleme solüsyonu ile karıştırılarak 90V'da 1 saat süreyle yürütülmüştür (Biol, 2018).

3.2.4.1 *Candida* türlerinden izole edilen total dna'ların *H. pylori* 16S rDNA gen bölgesi için spesifik primerler ile amplifikasyonu:

FISH analizi sonucunda içerisinde endofungal *H. pylori* tespit edilen *Candida* spp. izolatlarında *H. pylori*'ye özgü 16S rDNA gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. İçerisinde endofungal *H. pylori* bulunan *Candida* türlerinden ekstrakte edilen total DNA kullanılmıştır. Total DNA'dan *H. pylori*'ye özgü 16S rDNA gen bölgesinin amplifikasyonu HP1: 5'-GCA ATC AGC GTC AGT AAT GTT C-3' ve HP2: 5'-GCT AAG AGA TCA GCC TAT GTC C-3' primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyonun ardından ürünlerin agaroz jel elektroforezi sonucunda bant görülmemiştir. Bu sebeple PCR ürünlerini kalıp olarak kullanarak Nested PCR yapılmıştır. İlk PCR çalışmasının ardından hemen aynı gün Nested PCR çalışması gerçekleştirilmiştir. Farklı koşullar (Annealing sıcaklığı, MgCl₂ konsantrasyonu, döngü sayısı vb.) denenerek Nested PCR koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Nested PCR çalışmasında kalıp olarak bir önceki PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Nested PCR koşulları 16S rDNA gen bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan koşulların aynısıdır. Farklı döngü sayıları uygulanmış ancak en iyi sonuç ilk basamaktaki gibi 33 döngü ile elde edilmiştir. Optimize edilen koşullar altında çalışmaya devam edilmiştir. DNA amplifikasyonu, optimize edilmiş 50 µl'lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. PCR tüpüne sırasıyla koyulan bileşikler ve amplifikasyon koşulları Tablo 3.1'deki gibidir.

Tablo 3.1 *H. pylori*'ye özgü 16S rDNA gen bölgesinin amplifikasyonu sırasında PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları

Bileşik	Miktar
Bidistile su	30,6 µl
PCR reaksiyon tamponu	5 µl (10x)
MgCl ₂	4 µl (4Mm)
dNTP mix	1 µl
Primer HP1	2 µl (10 pmol/ µl)
Primer HP2	2 µl (10 pmol/ µl)
Taq DNA Polimeraz	0,4 µl (2U)
Kalıp DNA	5 µl (40-50 µg/ml)

Nested PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları

Bileşik	Miktar
Bidistile su	30,6 µl
PCR reaksiyon tamponu	5 µl (10x)
MgCl ₂	4 µl (4Mm)
dNTP mix	1 µl
Primer HP1	2 µl (10 pmol/ µl)
Primer HP2	2 µl (10 pmol/ µl)
Taq DNA Polimeraz	0,4 µl (2U)
PCR Ürünü	5 µl (40-50 µg/ml)

H.pylori'ye özgü 16S rDNA gen bölgesinin PCR koşulları ve Nested PCR koşulları

İŞLEM	DÖNGÜ	SÜRE	SICAKLIK
Başlangıç	1	3 dk	94 °C
Denatürasyon	33	45 sn	94 °C
Annealing		45 sn	55 °C
Elongasyon		1 dk	72 °C
Son uzama	1	5 dk	72 °C
Soğutma	-	∞	4°C

3.2.4.2 *Candida* türlerinden izole edilen total DNA'ların *H. pylori* virülans faktörlerini kodlayan gen bölgelerinin spesifik primerler ile amplifikasyonu:

vacA geninin amplifikasyonu:

İçerisinde endofungal *H.pylori* barındıran *Candida* türlerinden izole edilen total DNA'lar spesifik primerler ile amplifikasyona tabi tutulmuş ve *H.pylori*'nin virulans genlerinden vacA geninin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla vacA geni s1/s2 allelleri ve vacA geni m1/m2 allelleri araştırılmıştır. *H. pylori*'nin vacA

geninin s1/s2 allelinin 259-286 bp'lik fragmentinin amplifikasyonu VAI-F: 5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3' ve VAI-R: 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3' primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *H. pylori*'nin vacA geninin m1/m2 allelinin 567-642 bp'lik fragmentinin amplifikasyonu VAG-F: 5'-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3' ve VAG-R: 5'-GCGTCAAAATAATTCCAAGG-3' primerleri kullanılarak Nested PCR gerçekleştirilmiştir (Kishk vd., 2021). Farklı koşullar (Annealing sıcaklığı, MgCl₂ konsantrasyonu, döngü sayısı vb.) denenerek Nested PCR koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimize edilen koşullar ve miktarlar altında Nested PCR çalışmalarına devam edilmiştir. Çalışmalar 3 kere tekrarlanmıştır. Nested PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve amplifikasyon koşulları Tablo 3.2'deki gibidir.

Tablo 3.2 vacA geninin s1/s2 allelinin amplifikasyonu sırasında Nested PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları

Bileşik	Miktar
Bidistile su	30,6 µl
PCR reaksiyon tamponu	5 µl (10x)
MgCl ₂	4 µl (4Mm)
dNTP mix	1 µl
Primer VAI-F	2 µl (10 pmol/ µl)
Primer VAI-R	2 µl (10 pmol/ µl)
Taq DNA Polimeraz	0,4 µl (2U)
Kalıp DNA	5 µl (40-50 µg/ml)

vacA geninin m1/m2 allelinin amplifikasyonu sırasında Nested PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları

Bileşik	Miktar
Bidistile su	30,6 µl
PCR reaksiyon tamponu	5 µl (10x)
MgCl ₂	4 µl (4Mm)
dNTP mix	1 µl
Primer VAG-F	2 µl (10 pmol/ µl)
Primer VAG-R	2 µl (10 pmol/ µl)
Taq DNA Polimeraz	0,4 µl (2U)
Kalıp DNA	5 µl (40-50 µg/ml)

vacA geninin s1/s2 allelinin amplifikasyon koşulları

İŞLEM	DÖNGÜ	SÜRE	SICAKLIK
Başlangıç	1	3 dk	94 °C
Denatürasyon	30	1 dk	94 °C
Annealing		2 dk	47 °C
Elongasyon		4 dk	72 °C
Son uzama	1	5 dk	72 °C
Soğutma	-	∞	4 °C

vacA geninin m1/m2 allelinin amplifikasyon koşulları

İŞLEM	DÖNGÜ	SÜRE	SICAKLIK
Başlangıç	1	3 dk	94 °C
Denatürasyon	30	1 dk	94 °C
Annealing		2 dk	55 °C
Elongasyon		1 dk	72 °C
Son uzama	1	5 dk	72 °C
Soğutma	-	∞	4 °C

üreAB gen bölgesinin amplifikasyonu:

İçerisinde endofungal *H.pylori* barındıran *Candida* türlerinden izole edilen total DNA'larda *H.pylori*'nin virulans genlerinden üreAB geninin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla üreAB gen bölgesinin 406 bp'lik fragmentinin amplifikasyonu 2 forward primer F1: 5'-AACGAATTCAAAAAGCCGTTAGCGTGAAA-3' , F2: 5'-GTTTCCATGGCGCTAAAAGCGATGACAACT-3' ve 1 reverse primer 5'-GCAGGATCCACGCTAAGATTGTTTTAA-3' kullanılarak Nested PCR gerçekleştirilmiştir (Salmanian vd., 2008). Farklı koşullar (Annealing sıcaklığı, MgCl₂ konsantrasyonu, döngü sayısı vb.) denenerek PCR koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR tüpüne sırasıyla koyulan bileşimler ve amplifikasyon koşulları Tablo 3.3'deki gibidir.

Tablo 3.3 üreAB gen bölgesinin amplifikasyonu için PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları

Bileşik	Miktar
Bidistile su	30,6 µl
PCR reaksiyon tamponu	5 µl (10x)
MgCl ₂	4 µl (4Mm)
dNTP mix	1 µl
Primer F1	2 µl (10 pmol/ µl)
Primer R1	2 µl (10 pmol/ µl)
Taq DNA Polimeraz	0,4 µl (2U)
Kalıp DNA	5 µl (40-50 µg/ml)

Bileşik	Miktar
Bidistile su	30,6 µl
PCR reaksiyon tamponu	5 µl (10x)
MgCl ₂	4 µl (4Mm)
dNTP mix	1 µl
Primer F2	2 µl (10 pmol/ µl)
Primer R1	2 µl (10 pmol/ µl)
Taq DNA Polimeraz	0,4 µl (2U)
1.PCR ürünü	5 µl (40-50 µg/ml)

üreAB gen bölgesinin amplifikasyon koşulları

İŞLEM	DÖNGÜ	SÜRE	SICAKLIK
Başlangıç	1	3 dk	94 °C
Denatürasyon	30	1 dk	94 °C
Annealing		2 dk	53 °C
Elongasyon		1 dk	72 °C
Son uzama	1	5 dk	72 °C
Soğutma	-	∞	4 °C

3.2.5 İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* türlerine ait total dna'ların *C. albicans* spesifik primerler ile amplifikasyonu:

Chrom agar *Candida* ortamında yeşil koloni oluşturan, *C. albicans* olarak yorumlanan ve içerisinde endofungal *H. pylori* barındıran izolatların tür tanısını doğrulamak için *C. albicans* species- specific PCR yapılmıştır. Bu amaçla Büyük alt birim (26S) rDNA gen bölgesinin 5' ucunda bulunan 600 nükleotidlik değişken bölgesine (D1/D2) spesifik olarak dizayn edilen *C. albicans* spesifik CAL5 (5'-TGT TGC TCT CTC GGG GGC GGC CG-3'), NL4CAL(5'- AAG ATC ATT ATG CCA ACA TCC TAG GTA AA-3') ve NL5CAL (5'- AGA TCA TTA TGC CAA CAT CCT AGG TTA AA-3') primerleri kullanılmıştır (Abacı, 2010). PCR tüpüne sırasıyla koyulan bileşikler ve amplifikasyon koşulları Tablo 3.4'deki gibidir.

Tablo 3.4 SS-PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları

Bileşik	Miktar
Bidistile su	10,7 µl
PCR reaksiyon tamponu	2,5 µl (10x)
MgCl ₂	2,4 µl (4Mm)
dNTP mix	1 µl
CAL5	1 µl (5 pmol/ µl)
NL4CAL	1 µl (5 pmol/ µl)
NL5CAL	1 µl (5 pmol/ µl)
Taq DNA Polimeraz	0,4 µl (2U)
Kalıp DNA	5 µl (40-50 µg/ml)

Amplifikasyonun sağlandığı SS-PCR koşulları

İŞLEM	DÖNGÜ	SÜRE	SICAKLIK
Denatürasyon	1	4 dk	94 °C
Annealing		1 dk	67 °C
Elongasyon		20 sn	72 °C
Denatürasyon	35	20 sn	94 °C
Annealing		1 dk	67 °C
Elongasyon		20 sn	72 °C
Son uzama	1	4 dk	72 °C

3.2.6 İçerisinde endofungal olarak *H. pylori* barındıran *Candida* spp. izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması:

Chrom agar *Candida* ortamında farklı renkte koloni oluşturan ve içerisinde *H. pylori* barındıran *Candida* spp. izolatlarının tür düzeyinde tanısı için 26S rDNA'ya özgü universal primerler ve ITS1-5.8-ITS2 bölgesi (ITS) bölgesine özgü primerler kullanılarak PCR yapılmıştır. 26S rDNA'ya özgü NL4: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3' ve NL1: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' primerleri kullanılmıştır (Abacı, 2010). ITS PCR için ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ve ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' primerleri kullanılmıştır (Abacı, 2010). 26S gen bölgesinin amplifikasyonu için PCR tüpüne sırasıyla koyulan bileşikler ve amplifikasyon koşulları Tablo 3.5'deki gibidir. ITS1-5.8-ITS2 gen bölgesinin amplifikasyonu için PCR tüpüne sırasıyla koyulan bileşikler ve amplifikasyon koşulları Tablo 3.5'deki gibidir.

Tablo 3.5 26S rDNA PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları

Bileşik	Miktar
Bidistile su	21,3 µl
PCR reaksiyon tamponu	5 µl (10x)
MgCl ₂	7,2 µl (4Mm)
dNTP mix	2 µl
NL1	2 µl (10 pmol/ µl)
NL4	2 µl (10 pmol/ µl)
Taq DNA Polimeraz	0,5 µl (2U)
Kalıp DNA	10 µl (40-50 µg/ml)

26S PCR koşulları

İŞLEM	DÖNGÜ	SÜRE	SICAKLIK
Başlangıç	1	5 dk	95 °C
Denatürasyon	35	1 dk	95 °C
Annealing		1 dk	58 °C
Elongasyon		2 dk	72 °C
Son uzama	1	10 dk	72 °C
Soğutma	-	∞	4 °C

Tablo 3.6 ITS PCR tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları

Bileşik	Miktar
Bidistile su	34,6 µl
PCR reaksiyon tamponu	5 µl (10x)
MgCl ₂	4 µl (4Mm)
dNTP mix	1 µl
NL1	2 µl (10 pmol/ µl)
NL4	2 µl (10 pmol/ µl)
Taq DNA Polimeraz	0,4 µl (2U)
Kalıp DNA	1 µl (40-50 µg/ml)

ITS PCR koşulları

İŞLEM	DÖNGÜ	SÜRE	SICAKLIK
Başlangıç	1	3 dk	94 °C
Denatürasyon	35	1 dk	94 °C
Annealing		1 dk	60 °C
Elongasyon		1 dk	72 °C
Son uzama		5 dk	72 °C
Sogutma	-	∞	4 °C

3.2.7 *Candida* türlerinden endofungal *H. pylori* suşlarını kültüre etme çalışmaları:

Candida spp. vakuolü içerisinde endofungal olarak yaşayan *H. pylori* suşlarını kültüre etmek amacı ile farklı denemeler yapılmıştır (Tavalokian vd., 2018; Heydari vd., 2020).

Deneme 1:

- 24 saatlik aktif *Candida* spp. hücreleri içerisinde steril MYGP-B bulunan tüpler içerisine alınmıştır. Steril çubuklar kullanılarak maya hücreleri parçalanmıştır. Ve tüpler hızlı bir şekilde vortekslenmiştir. Bu aşamadaki amaç maya hücre duvarını fiziksel olarak parçalanmasını sağlamaktır.
- Parçalanmış hücrelerin bulunduğu süspansiyondan içerisinde antifungal amfoterisin B bulunan %10 insan kanı eklenmiş BHI-A ortamına ve içerisinde antifungal amfoterisin B bulunan %10 insan kanı eklenmiş Kan Agar ortamına ekimi gerçekleştirilmiştir.
- Petriler aerobik, içerisinde anaerobik kit yerleştirilen Gas Pack Jar ve içerisinde mikroaerofilik kit yerleştirilen Gas Pack Jar içerisinde 37 °C’de inkübe edilmiştir. Petrilerdeki bakteri üremesi 3-4 hafta kontrol edilmiştir.

Mikroaerofilik koşullarda inkübasyon

- Petriler içerisine mikroaerofilik kitler yerleştirilen Gas Pack jar içerisinde 37 °C’de 3-4 hafta boyunca inkübe edilmiştir. Petriler haftalık olarak kontrol edilip, kontrol esnasında içerisinde bulunan kitler yenilenmiştir.

Anaerobik koşullarda inkübasyon

- Petriler içerisinde anaerobik kitler yerleştirilen Gas Pack jar içerisinde 37 °C'de 3-4 hafta boyunca inkübe edilmiştir. Petriler haftalık olarak kontrol edilip, kontrol esnasında içerisinde bulunan kitler yenilenmiştir.

Aerobik koşullarda inkübasyon

- Petriler aerobik koşullar altında 37 °C'de 3-4 hafta boyunca inkübe edilmiştir. Petriler günlük olarak kontrol edilmiştir, kontrol esnasında içerisinde bulunan kitler yenilenmiştir.

Deneme 2:

- 24 saatlik aktif *Candida* spp. izolatları içerisinde steril 5 ml distile su bulunan tüplere aşılanmıştır.
- Tüpler 37 °C'de 7-28 gün boyunca inkübe edilmiştir.
- 7 gün sonra 50 µl distile su kültürlerinden içerisinde antifungal amfoterisin B bulunan %10 insan kanı eklenmiş BHI-A ortamına ve içerisinde antifungal amfoterisin B bulunan %10 insan kanı eklenmiş Kan Agar ortamına spotlama şeklinde inoküle edilmiştir ve petriler mikroaerofilik (Gas Pack jar içerisinde mikroaerofilik ortam oluşturan kitlerle), anaerobik (Gas Pack jarlar içerisinde anaerobik ortam oluşturan kitlerle) ve aerobik koşullar altında 37 °C'de inkübe edilmiştir. Aerobik koşullar altındaki petriler günlük anaerobik ve aerofilik koşullar altında inkübe edilen petrilerdeki bakteri büyümesi haftalık olarak kontrol edilmiştir.
- Aynı işlemler 14., 21. ve 28. günde de gerçekleştirilmiştir.

Deneme 3:

- 24 saatlik aktif petride büyütülen *Candida* spp. kültürlerinden bir miktar alınmıştır.
- Hücreler steril PBS ile 3 kez yıkanmıştır.
- Yıkanan hücreler içerisinde steril cam boncuk bulunan tüplere aktarılmıştır ve üzerine Wash Buffer (20mM Tris/HCl, 100mM NaCl) eklenmiştir.
- Hücreler 3 dk boyunca vortekslenmiştir. Bu aşamada maya hücre duvarının başarılı bir şekilde parçalanması hedeflenmektedir.

- Boncuklar ve Wash Buffer uzaklaştırıldıktan sonra, dipte kalan parçalanmış maya pelleti, steril maya ortamında (MYGP-Broth) süspanse edilmiştir. Süspansiyon iyice vorteklenmiştir.
- İçerisinde antifungal amfoterisin B bulunan %10 insan kanı eklenmiş Kan agara ve içerisinde antifungal amfoterisin B bulunan %10 insan kanı eklenmiş BHI-A ortamına çizgi ekim yapılmıştır. Petriler GasPack jar içerisinde mikroaerofilik koşullar altında inkübe edilmiştir. Petrideki üreme kontrol edilmiştir (Tavalokian vd., 2018).

Deneme 4:

- 24 saatlik *Candida* kültürlerinden bir miktar alınır.
- İçerisinde steril MYGP-B bulunan tüplere aktarılır.
- Tüpler vortekslenir ve mekanik olarak parçalanır.
- Elde edilen süspansiyondan üre agar ortamına ekim yapılır. Üre agar içerisinde üre ve bir ph indikatörü olan fenol red içermektedir. *Helicobacter pylori* ortamdaki üreyi kullandığında ortamı alkali hale getirerek amonyak oluşturmaktadır. Üreaz pozitif *H. pylori*'ler bu ortamda ortamın rengini sarıdan pembe-kırmızıya dönüştürmektedir. Üreaz negatif durumunda ortamın rengi sarı kalmaktadır.
- Petriler ayrı ayrı içerisinde mikroaerofilik kit bulunan Gas Pack Jar , anaerobik kit bulunan Gas Pack Jar ve aerobik koşullar altında 37 °C'de inkübe edilir.
- Petrilerdeki büyüme kontrol edilmiştir.

3.2.8 *Candida* türlerinin in vitro antifungal duyarlılık testleri:

İçerisinde endofungal olarak *H. pylori* bulunduran *Candida* spp. izolatlarının amfoterisin B ve flukonazole karşı in vitro antifungal duyarlılık testleri gerçekleştirilmiştir. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu tayini gerçekleştirilmiştir. Böylece *Candida* spp. izolatlarının üremesini durduran en

düşük antifungal miktarı belirlenmiştir. Deney 96 kuyucuklu steril mikro plakalar içerisinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Steril mikro plakalara aşılanan antifungaller ve *Candida* izolatları

Kontrol örnek olarak *Candida albicans* ATCC 10231 suşu kullanılmıştır. Her iki antifungal ajanın nihai konsantrasyonları 0,125µg/ml - 64 µg/ml olmuştur. *Candida* izolatı için MYGP-A besiyerinde üreyen 24 saatlik aktif kültürlerden koloniler alınarak, % 0,85 NaCl içinde süspanse edilmiştir ve 0,5 McFarland standard yoğunluğunda süspansiyon elde edilmiştir. Steril MYGP-B besiyeri mikro kuyucuklara eklenmiştir. Besiyeri ortamı eklenen mikro kuyucuklara antifungal ajanlar eklenmiştir ve son olarak üzerilerine maya süspansiyonlarından ilave edilmiştir. Mikro plakalar 37°C’de 24-48 saat inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir.

3.2.9 İstatistiksel analizler:

Tüm istatistiksel analizlerde SPSS25.0 paket programı kullanılmıştır. Grup karşılaştırmalarında ki-kare analizi kullanılmıştır. P değerinin 0,05'ten küçük olması ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

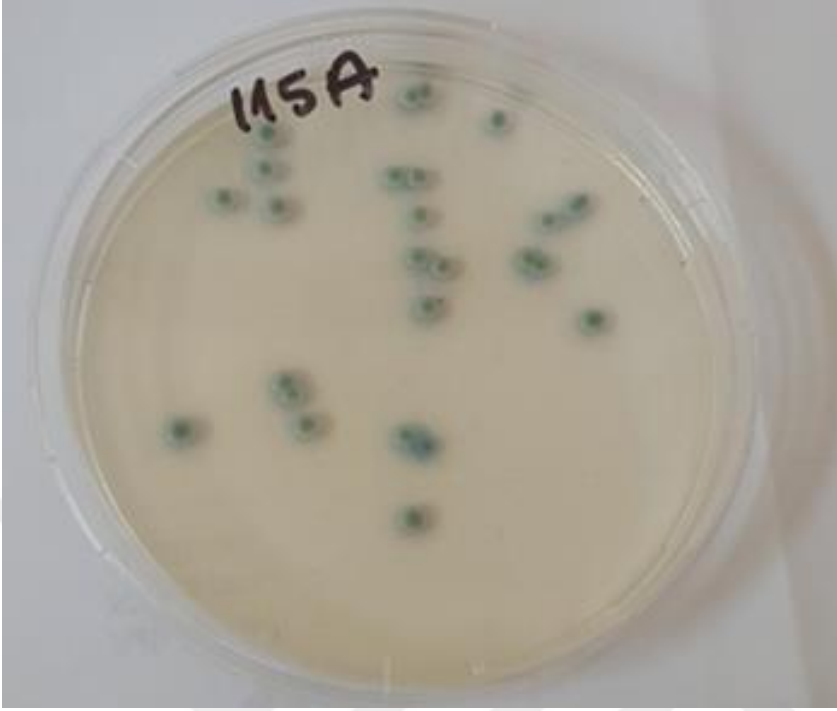
4.1 Çalışma Grubunu Oluşturan Bireyler

Çalışmada power analizle %95 güven aralığında ve %80 güç oranında 233 hasta analize alınmıştır. Mide biyopsi örnekleri alınan hastaların işlem öncesi doldurulan olgu rapor formu bilgilerine göre Özofagogastroduodenoskopi (ÖGD-Üst GİS Endoskopisi) yapılma nedenlerinin atrofik gastrit, demir eksikliği anemisi, disfaji, dispepsi, epigastrik ağrı, GİS (Gastrointestinal sistem) kanama, kronik ishal, malignite tarama, MALTOMA, reflü, ülser olduğu tespit edilmiştir.

4.2 *Candida* spp. İzolasyonu

Bu çalışmayı gerçekleştirmek için çeşitli şikayetleri nedeniyle Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji kliniğine başvuran ve takip eden hekimi tarafından tıbbi açıdan özofagogastroduodenoskopi (ÖGD-Üst GİS Endoskopisi) işlem endikasyonu konulan hastaların midelerinin antrum ve korpus bölgelerinden mide biyopsi örnekleri alınmıştır. Bu mide biyopsi örneklerinden *Candida* spp. izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

İzolasyon amacı ile Harlequin® *Candida* Chromogenic Agar besiyeri kullanılmış ve *Candida* türlerinin seçiminde kullanma talimatına uyulmuştur. Buna göre besiyerinde bulunan kromojenik substrat sayesinde *Candida albicans* kolonileri yeşil, *Candida krusei* kolonileri mor-pembe, *Candida tropicalis* kolonileri mavi renkte görünmektedir (Şekil 4.1). Çalışmaya alınan 233 hastanın 94'ünün mide biyopsi örneklerinden *Candida* spp. izole edilmiştir.



Şekil 4.1. 115A kodlu izolatin *Candida* Chromogenic Agar ortamındaki görüntüsü

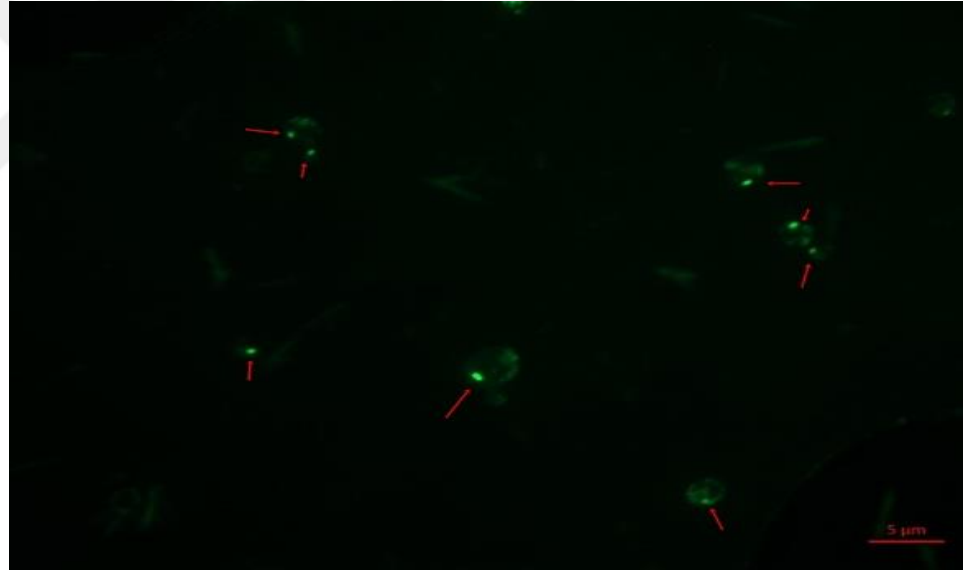
94 hastanın midesinin antrum bölgesinden izole edilen *Candida* spp. izolatu sayısı 92 ve korpus bölgesinden izole edilen *Candida* spp. izolatu sayısı 67'dir. 41 hastanın hem antrum hem korpus bölgesinden, 34 hastanın sadece antrum bölgesinden ve 19 hastanın sadece korpus bölgesinden olmak üzere 159 *Candida* izole edilmiştir.

4.3 FISH Yöntemi İle *Candida* Türleri İçerisinde Endofungal *H. pylori* Varlığının Araştırılması

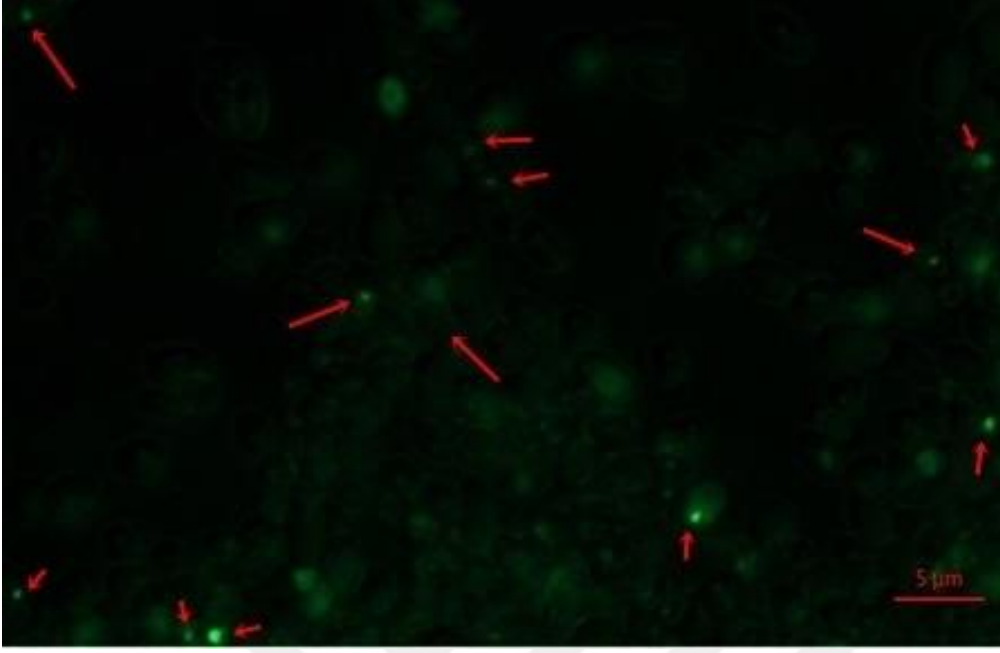
Candida mayalarının vakuolü içerisinde endofungal *H.pylori* varlığını araştırmak amacı ile FISH analizi gerçekleştirilmiştir. FISH analizini IYTE-BIYOMER'de kendimiz gerçekleştirdik. 159 *Candida* izolatında hücre-içi endofungal bakterilerin varlığının araştırılması amacıyla bakterilere özgü EUB338

prob ve endofungal *H.pylori* varlığını araştırmak amacıyla *H. pylori*'ye özgü Hpy prob kullanılarak eş zamanlı olarak FISH analizi gerçekleştirilmiştir. 159 *Candida* izolatının 99 tanesinde hücre-içi endofungal bakteri tespit edilmiştir. 51 için bakterilere özgü EUB338 prob ile hibridizasyon tesbit edilmesine rağmen *H. pylori*'ye özgü Hpy prob ile hibridizasyon saptanmamıştır. Bu sonuç 51 izolatta *H. pylori* dışı bakteri varlığını işaret etmektedir. İncelenen *Candida* izolatlarının sadece 48 tanesinde endofungal *H. pylori* tespit edilmiştir.

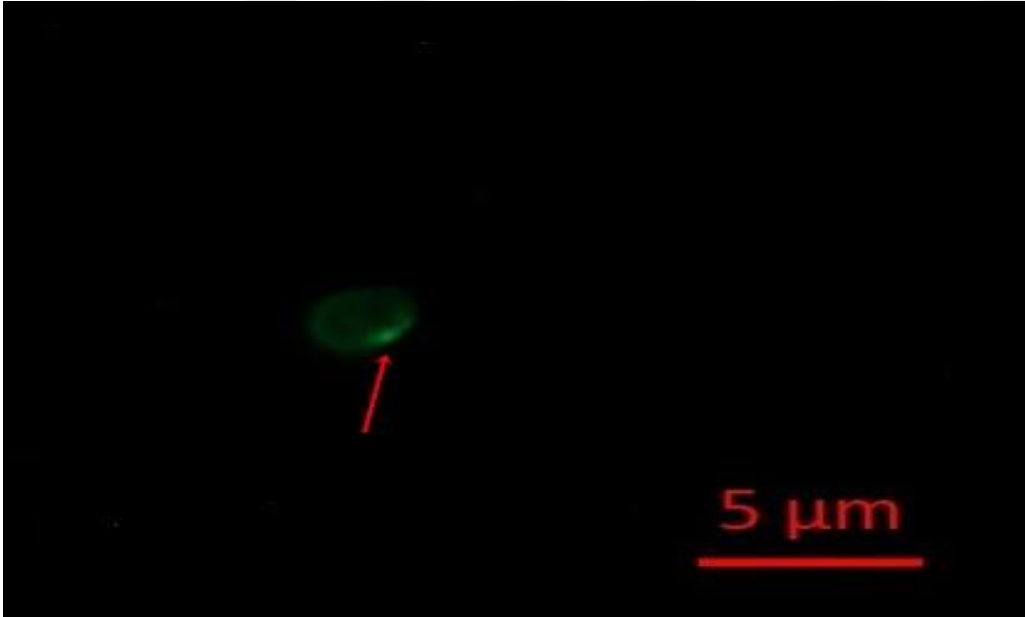
Aşağıdaki şekillerde görüldüğü gibi endofungal *H.pylori* maya vakuölü içerisinde sarı-yeşil renkte görülmektedir. Maya hücrelerinde gözlenen sarı-yeşil floresans, bakterilere özgü floresan probunun hibridizasyonunun bir sonucudur.



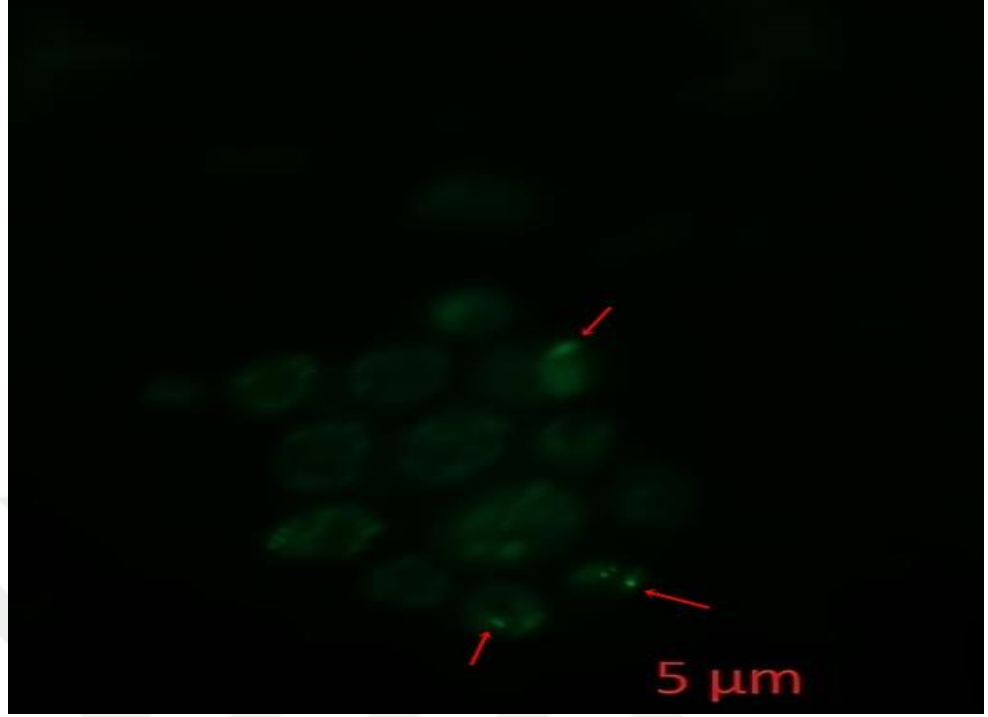
Şekil 4.2. Bakterispesifik cy3-etiketli EUB338 floresan probu ile hibridizasyonu yapılan 2A kodlu *Candida* izolatının FISH görüntüleri



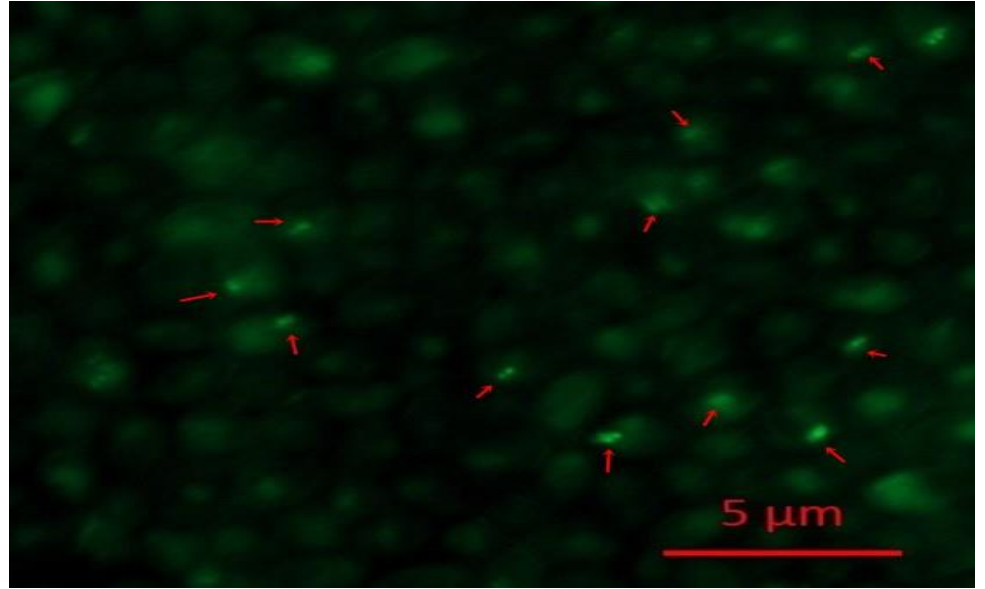
Şekil 4.3. *H. pylori*'ye spesifik cy3-etiketli Hpy floresan probu ile hibridizasyonu yapılan 23A kodlu *Candida* izolatının FISH görüntüleri



Şekil 4.4. *H. pylori*'ye spesifik cy3-etiketli Hpy floresan probu ile hibridizasyonu yapılan 115A kodlu *Candida* izolatının FISH görüntüleri



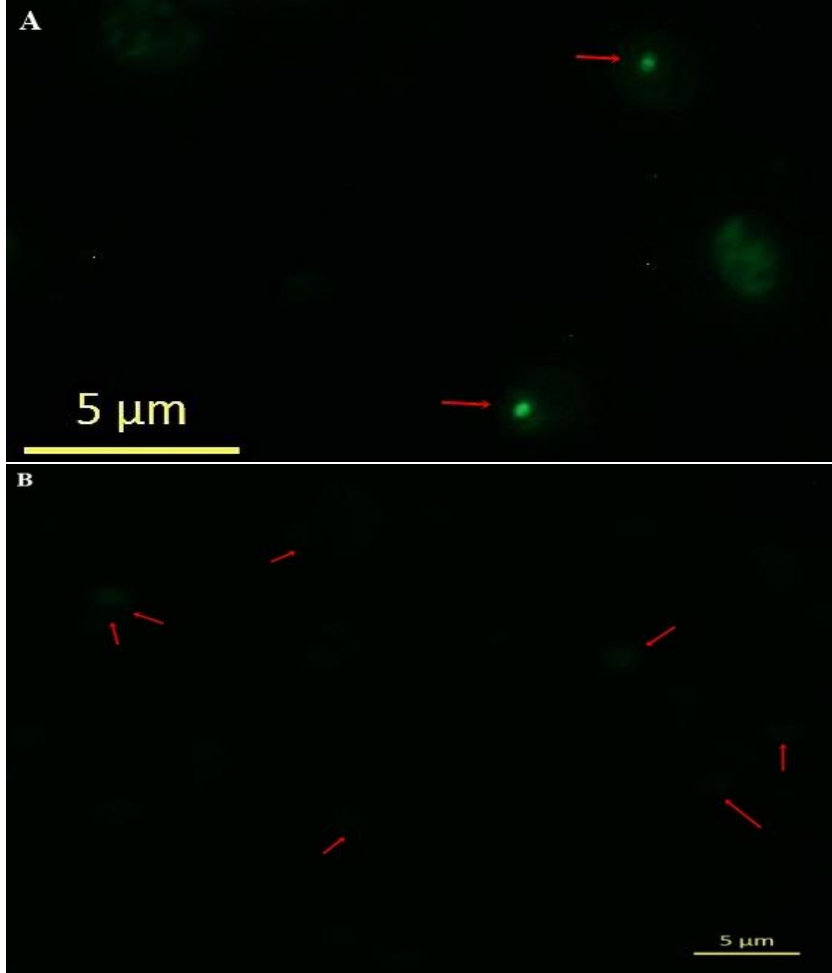
Şekil 4.5. *H. pylori*'ye spesifik cy3-etiketli Hpy floresan probu ile hibridizasyonu yapılan 126K kodlu *Candida* izolatının FISH görüntüleri



Şekil 4.6. *H. pylori*'ye spesifik cy3-etiketli Hpy floresan probu ile hibridizasyonu yapılan 246K kodlu *Candida* izolatının FISH görüntüleri

Daha önce de açıklandığı gibi tüm *Candida* izolatları için FISH analizi eş zamanlı olarak bakteri spesifik cy3-etiketli EUB338 prob ve *H. pylori* spesifik cy3-

etiketli Hpy prob kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 290K kodlu izolatin cy3-etiketli EUB338 prob kullanılarak ve cy3-etiketli Hpy prob kullanılarak gerçekleştirilen FISH analizlerinin ardından hazırlanan preparatların floresan mikroskobu altında alan taramaları gerçekleştirilmiştir ve görüntüleri kaydedilmiştir (Şekil 4.7). EUB338 prob kullanılarak gerçekleştirilen analizde sarı-yeşil floresan ışımaya görünürken, Hpy prob kullanılarak gerçekleştirilen analizde ışımaya görülmemiştir. Böylece *Candida* içinde endofungal bakteri varlığı saptanırken, *H. pylori* saptanmamıştır.



Şekil 4.7. A. Bakteri spesifik cy3-etiketli EUB338 prob ile hibridizasyonu yapılan 290K kodlu kodlu *Candida* izolatinin FISH görüntüleri B. *H. pylori*'ye spesifik cy3-etiketli Hpy floresan probu ile hibridizasyonu yapılan 290K kodlu kodlu *Candida* izolatinin FISH görüntüleri

FISH analizi sonucunda 48 *Candida* izolatının vakuolünde endofungal *H. pylori* tespit edilmiştir. *Candida* spp. izolatlarında endofungal bakteri varlığı ve endofungal *H. pylori* varlığı , hastaların daha önce *H. pylori* tedavisi alıp almadığı ve ÖGD yapılma nedenleri Tablo 4.1’de özetlenmiştir (Tablo 4.1).



Tablo 4.1 *Candida* izolatlarında endofungal bakteri varlığı, endofungal *H.pylori* varlığı, *H. pylori* tedavisi alıp almadığı, ÖGD yapılma nedeni

	<i>Candida</i> sp. İzolat Kodu	<i>Candida</i> içinde endofungal bakteri varlığı	<i>Candida</i> içinde endofungal <i>H.pylori</i> varlığı	Daha önce <i>H. pylori</i> tedavisi aldı mı?	ÖGD yapılma nedeni
1.	2A	+	+	Evet	Epigastrik ağrı
2.	4K	+	+	Evet	Dispepsi
3.	23A	+	+	Evet	Dispepsi
	24K	+	+		
4.	33A	+	+	Hayır	Malignite tarama
	34K	+	+		
5.	37A	+	+	Evet	Epigastrik ağrı
	38K	+	+		
6.	41A	+	+	Hayır	Dispepsi
	42K	+	-		
7.	61A	-	-	Hayır	Dispepsi
8.	67A	-	-	Hayır	Epigastrik ağrı
	67A1	-	-		
	68K	-	-		
9.	69A	-	-	Hayır	Epigastrik ağrı
	70K	+	-		
10.	74K	+	+	Hayır	Epigastrik ağrı
11.	82K	+	-	Evet	Malignite tarama
12.	95A	+	-	Hayır	Atrofik gastrit
13.	102K	+	-	Hayır	Malignite tarama
14.	105A	-	-	Evet	Reflü
15.	114K1	+	+	Hayır	Malignite tarama
	114K2	+	+		
16.	115A	+	+	Hayır	Dispepsi
	116K	+	+		

Tablo 4.1 Devam

	<i>Candida</i> sp. İzolat Kodu	<i>Candida</i> içinde endofungal bakteri varlığı	<i>Candida</i> içinde endofungal <i>H.pylori</i> varlığı	Daha önce <i>H. pylori</i> tedavisi aldı mı?	ÖGD yapılma nedeni
17.	117A1	-	-	Hayır	Malignite tarama
	117A2	-	-		
	118K1	+	-		
	118K3	-	-		
18.	119A	+	+	Evet	Atrofik gastrit
19.	121A1	-	-	Hayır	Dispepsi
20.	125A1	-	-	Evet	Malignite tarama
	126K	+	+		
21.	127A	+	+	Evet	Demir eksikliği anemisi
	128K	+	-		
22.	129A	+	+	Evet	Epigastrik ağrı
23.	131A1	+	-	Hayır	Epigastrik ağrı
	131A2	+	-		
24.	133A	-	-	Evet	Malignite tarama
	134K	-	-		
25.	135A	+	-	Hayır	Malignite tarama
	136K	+	+		
26.	137A	-	-	Evet	Epigastrik ağrı
27.	139A	-	-	Evet	Dispepsi
	140K	+	-		
28.	145A	-	-	Hayır	Epigastrik ağrı
	146K	-	-		
29.	163A	-	-	Hayır	Demir eksikliği anemisi
	164K	+	-		
30.	165A	+	+	Hayır	Malignite tarama
	166K	+	+		
31.	169K	+	-	Hayır	Malignite tarama
32.	171A	+	-	Hayır	Disfaji

Tablo 4.1 devam					
33.	173A	-	-	Hayır	Reflü
34.	177A	+	-	Evet	Dispepsi
	178K	+	-		
35.	185A	-	-	Hayır	Malignite tarama
36.	199A	+	+	Hayır	Epigastrik ağrı
	200K	+	-		
37.	204K	+	+	Hayır	Atrofik gastrit
38.	214K	+	+	Hayır	Dispepsi
39.	217A	-	-	Hayır	Dispepsi
40.	221A	+	-	Evet	Dispepsi
41.	229A	-	-	Hayır	Demir eksikliği anemisi
42.	231A	-	-	Hayır	Malignite tarama
43.	236K	+	-	Hayır	Epigastrik ağrı
44.	239A	+	+	Hayır	Malignite tarama
	240K	+	-		
45.	243A	+	-	Hayır	Demir eksikliği anemisi
	244K	+	-		
46.	246K	+	+	Hayır	Epigastrik ağrı
47.	250K	+	+	Hayır	Malignite tarama
48.	254K1	-	-	Evet	Dispepsi
	254K2	-	-		
49.	257A	+	+	Hayır	Malignite tarama
	258K	+	-		
50.	259A	+	-	Evet	Epigastrik ağrı
	260K	+	+		
51.	261A	-	-	Hayır	Malignite tarama
52.	263A	+	+	Hayır	Disfaji
53.	267A1	-	-	Evet	Dispepsi
	267A2	+	-		
	268K	-	-		
54.	277A1	+	-	Hayır	Epigastrik ağrı
	277A2	-	-		
55.	279A1	-	-	Hayır	MALTOMA
	279A2	+	-		
56.	285A	+	+	Hayır	Malignite tarama

Tablo 4.1 Devam

	<i>Candida</i> sp. İzolat Kodu	<i>Candida</i> içinde endofungal bakteri varlığı	<i>Candida</i> içinde endofungal <i>H.pylori</i> varlığı	Daha önce <i>H. pylori</i> tedavisi aldı mı?	ÖGD yapılma nedeni
57.	289A 290K	+	-	Hayır	Malignite tarama
58.	293A 294K	+	-	Hayır	Demir eksikliği anemisi
59.	296K	-	-	Hayır	Epigastrik ağrı
60.	297A 298K	-	-	Hayır	Demir eksikliği anemisi
61.	299A1 299A2 300K1 300K2	+	+	Evet	Malignite tarama
62.	305A 306K	+	+	Hayır	Malignite tarama
63.	319A 320K	-	-	Hayır	Malignite tarama
64.	321A	-	-	Hayır	Demir eksikliği anemisi
65.	323A	+	+	Hayır	Malignite tarama
66.	326K	-	-	Evet	Malignite tarama
67.	332A1 332A2	-	-	Hayır	Malignite tarama
68.	341A	+	-	Hayır	Dispepsi
69.	345A 346K1 346K2	+	-	Hayır	Dispepsi
70.	349A	+	-	Hayır	Epigastrik ağrı
71.	351A1 351A2 351A3	-	-	Hayır	Dispepsi
72.	358K	+	-	Hayır	Malignite tarama

Tablo 4.1 Devam					
73.	361A 362K	+	+	Evet	Dispepsi
74.	365A	+	+	Hayır	Malignite tarama
75.	367A1	-	-	Hayır	Demir eksikliği anemisi
	367A2	-	-		
	368K1	-	-		
	368K2	+	+		
76.	369A1	+	+	Hayır	Malignite tarama
	369A2	-	-		
	369A3	+	+		
	370K1	-	-		
	370K2	+	+		
77.	371A	-	-	Hayır	Demir eksikliği anemisi
78.	375A	-	-	Hayır	Dispepsi
79.	381A	+	-	Hayır	Malignite tarama
	382K	+	-		
80.	383A	-	-	Hayır	Malignite tarama
	384K	-	-		
81.	392K	+	+	Hayır	Disfaji
82.	395A1	-	-	Hayır	Ülser
	395A2	-	-		
	395A3	-	-		
83.	400K	+	+	Evet	Demir eksikliği anemisi
84.	401A	-	-	Hayır	Malignite tarama
85.	403A	-	-	Evet	Atrofik gastrit
	404K	-	-		
86.	405A1	+	-	Hayır	Atrofik gastrit
	405A2	+	+		
	406K	+	+		
87.	407A	-	-	Hayır	Dispepsi
88.	409A	+	-	Hayır	Malignite tarama
	410K	-	-		
89.	411A1	+	-	Hayır	Demir eksikliği anemisi
	411A2	-	-		
	412K1	-	-		
	412K2	+	-		
90.	413A	+	-	Hayır	Ülser
91.	424K	+	-	Hayır	Malignite tarama
92.	431A	+	-	Hayır	Dispepsi

93.	444K	+	-	Hayır	Reflü
94.	449A	+	-	Hayır	Reflü
	450K	-	-		

A: Antrum bölgesinden izole edilen izolat, K: Korpus bölgesinden izole edilen izolat

FISH analizi sonucunda içerisinde endofungal olarak *H. pylori* bulunduğu tespit edilen *Candida* izolatlarının izole edildiği mide biyopsi örneklerinin *H. pylori* varlığı açısından histopatolojik inceleme sonucu, hastanın ÖGD yapılma nedeni, hastanın endoskopi raporu, diş protezi varlığı, beslenme alışkanlığı, ek hastalıklar, son bir haftadır antibiyotik kullanımı Tablo 4.2’de verilmiştir (Tablo 4.2). (HT:Hipertansiyon; DM:Diyabet)



Tablo 4.2 *Candida* sp. izolat kodu, mide biyopsi örneklerinin *H. pylori* varlığı açısından histopatolojik inceleme sonucu, ÖGD yapılma nedeni, endoskopi raporu, dış protezi varlığı, beslenme alışkanlığı, ek hastalıklar, son bir haftadır antibiyotik kullanımı

No	<i>Candida</i> sp. İzolat kodu	Mide biyopsi örneklerinin <i>H. pylori</i> varlığı açısından histopatolojik inceleme sonucu		ÖGD yapılma nedeni	Endoskopi raporu	Dış protezi	Beslenme alışkanlığı	Ek hastalık	Son 1 haftadır antibiyotik kullanımı
		Antrum	Korpus						
1	2A	-	-	Epigastrik ağrı	Eritematöz antral gastrit	Yok	Dengeli	Yok	Hayır
2	4K	-	-	Dispepsi	Normal Üst GİS Endoskopik İncelemesi	Yok	Dengeli	Malignite	Hayır
3	23A	+++	+++	Dispepsi	Eritematöz antral gastrit	Yok	Dengeli	Tiroid hastalığı	Hayır
	24K								
4	33A	-	-	Malignite tarama	Eritematöz antral gastrit	Yok	Dengeli	HT, DM	Hayır
	34K								
5	37A	-	-	Epigastrik ağrı	Eritematöz antral gastrit	Var	Dengeli	Yok	Hayır
	38K								
6	41A	-	-	Dispepsi	Eritematöz antral gastrit	Yok	Dengeli	DM, Tiroid hastalığı	Evet
7	74K	+	++	Epigastrik ağrı	Hiatus hernisi (mide fıtığı)	Yok	Dengeli	Yok	Hayır
8	114K1	-	-	Malignite tarama	Normal Üst GİS Endoskopik İncelemesi	Var	Dengeli	Malignite	Hayır
	114K2								
9	115A	-	-	Dispepsi	Normal Üst GİS Endoskopik İncelemesi	Yok	Dengeli	HT	Hayır
	116K								
10	119A	-	-	Atrofik gastrit	İntestinal metaplazi? Eritematöz antral gastrit	Yok	Dengeli	Dermatit	Hayır
11	126K	-	-	Malignite tarama	Eritematöz antral gastrit	Yok	Dengeli	Yok	Hayır
12	127A	-	-	Demir eksikliği anemisi	Eritematöz antral gastrit	Yok	Dengeli	Yok	Evet

Tablo 4.2 devam

No	Candida sp. İzolat kodu	Mide biyopsi örneklerinin <i>H. pylori</i> varlığı açısından histopatolojik inceleme sonucu		ÖGD yapılma nedeni	Endoskopi raporu	Diş protezi	Beslenme alışkanlığı	Ek hastalık	Son 1 haftadır antibiyotik kullanımı
		Antrum	Korpus						
13	129A	-	-	Epigastrik ağrı	İntestinal metaplazi? Eritematöz antral gastrit	Yok	Dengeli	Yok	Hayır
14	136K	+	++	Malignite tarama	Eritematöz antral gastrit	Var	Dengeli	HT, DM	Hayır
15	165A 166K	-	-	Malignite tarama	Normal Üst GİS Endoskopik İncelemesi	Yok	Dengeli	Kalp hastalığı	Hayır
16	199A	+++	++	Epigastrik ağrı	İntestinal metaplazi? Eritematöz antral gastrit	Var	Karbonhidrat	Nörolojik Hastalık	Hayır
17	204K	-	-	Atrofik gastrit	Eritematöz antral gastrit	Yok	Protein	DM	Hayır
18	214K	-	-	Dispepsi	Normal Üst GİS Endoskopik İncelemesi	Yok	Dengeli	Yok	Hayır
19	239A	-	-	Malignite tarama	Eritematöz antral gastrit	Yok	Dengeli	Yok	Hayır
20	246K	-	-	Epigastrik ağrı	Normal Üst GİS Endoskopik İncelemesi	Yok	Dengeli	Yok	Hayır
21	250K	-	-	Malignite tarama	Eritematöz antral gastrit	Yok	Dengeli	Yok	Hayır
22	257A	++	++	Malignite tarama	Normal Üst GİS Endoskopik İncelemesi	Yok	Dengeli	HT, DM	Hayır
23	260K	-	-	Epigastrik ağrı	Eritematöz antral gastrit	Yok	Dengeli	HT	Hayır
24	263A	-	-	Disfaji	Kalkık eroziv antral gastrit	Yok	Dengeli	HT	Hayır
25	285A	-	-	Malignite tarama	Atrofik korpus gastriti, eritematöz antral gastrit, ülser	Var	Protein	Kalp has., böbrek has.	Hayır

Tablo 4.2 devam

No	Candida sp. izolat kodu	Mide biyopsi örneklerinin <i>H. pylori</i> varlığı açısından histopatolojik inceleme sonucu		ÖGD yapılma nedeni	Endoskopi raporu	Dış protezi	Beslenme alışkanlığı	Ek hastalık	Son 1 haftadır antibiyotik kullanımı
		Antrum	Korpus						
26	299A1 299A2 300K2	-	-	Malignite tarama	İntestinal metaplazi? Eritematöz antral gastrit	Yok	Protein	Malignite	Evet
27	305A	+++	+++	Malignite tarama	İntestinal metaplazi? Eritematöz antral gastrit, Polipoid lezyon	Yok	Protein	Yok	Hayır
28	323A	-	-	Malignite tarama	Eritematöz antral gastrit	Yok	Dengeli	Yok	Hayır
29	332A2	+++	++	Malignite tarama	Eritematöz pangastrit, İntestinal metaplazi odakları, bulbit	Yok	Dengeli	DM	Hayır
30	351A3	+++	+++	Dispepsi	Kalkık eroziv antral gastrit	Yok	Dengeli	Yok	Hayır
31	361A	-	-	Dispepsi	Kalkık eroziv antral gastrit	Yok	Dengeli	Yok	Hayır
32	365A	-	-	Malignite tarama	Hiatus hernisi, eritematöz antral gastrit, bulbit	Yok	Dengeli	Yok	Hayır
33	368K2	-	-	Demir eksikliği anemisi	Hiatus hernisi, kalkık eroziv antral gastrit	Yok	Dengeli	HT	Hayır

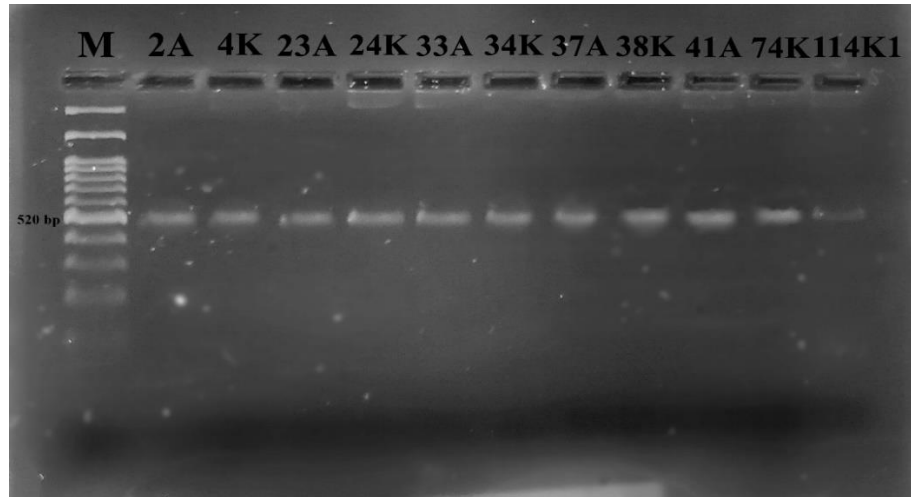
Tablo 4.2 devam

No	Candida sp. izolat kodu	Mide biyopsi örneklerinin H. pylori varlığı açısından histopatolojik inceleme sonucu		ÖGD yapılma nedeni	Endoskopi raporu	Dış protezi	Beslenme alışkanlığı	Ek hastalık	Son 1 haftadır antibiyotik kullanımı
		Antrum	Korpus						
34	369A1 369A3 370K2	-	-	Malignite tarama	Eritematöz antral gastrit	Yok	Protein	Lenfoma	Evet
35	392K	++	-	Disfaji	Normal Üst GİS Endoskopik İncelemesi	Yok	Dengeli	Yok	Hayır
36	400K	-	-	Demir eksikliği anemisi	Eroziv antral gastrit	Yok	Dengeli	DM	Hayır
37	405A2 406K	-	-	Atrofik gastrit	Antrumda polip (Hiperplastik polip?)	Var	Dengeli	Karaciğer siroz başlangıcı	Hayır

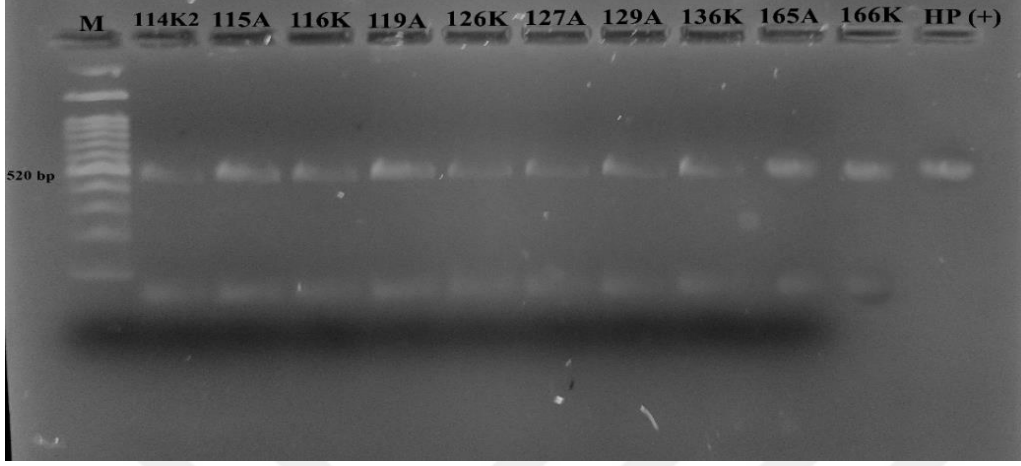
4.4 PCR tabanlı moleküler yöntemler ile *Candida* türleri içerisinde endofungal *H. pylori* varlığının araştırılması

4.4.1 *Candida* türlerinden izole edilen total DNA'ların *H. pylori* 16S rDNA gen bölgesi için spesifik primerler ile amplifikasyonu:

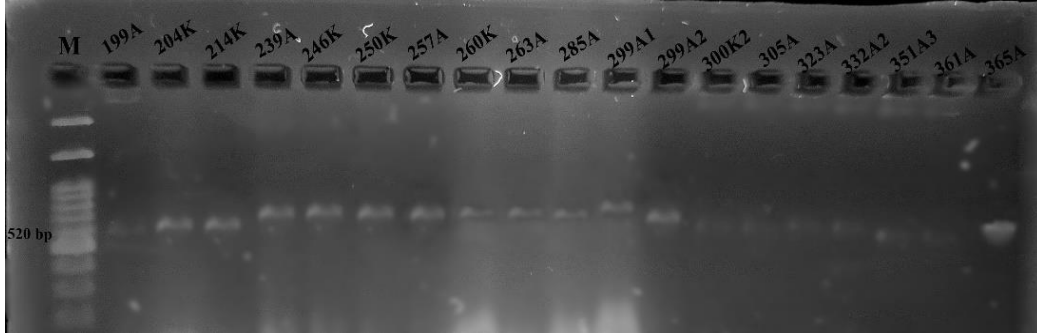
FISH analizi sonucunda içerisinde endofungal *H. pylori* varlığı tespit edilen 48 *Candida* izolatından DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarının total DNA'sı ve *H. pylori* 16S rDNA gen bölgesi için spesifik primerlerin kullanıldığı Nested-PCR ile amplifiye edilmiştir. *Candida* izolatlarının total DNA'sından *H. pylori*'nin 16S rDNA gen bölgesinin 520 bp'lik fragmentinin amplifikasyonu için HP1: 5'-GCA ATC AGC GTC AGT AAT GTT C-3' ve HP2: 5'-GCT AAG AGA TCA GCC TAT GTC C-3' primerleri kullanılarak Nested-PCR gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon ürünleri % 2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezi sonuçları Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10. ve Şekil 4.11.'de gösterilmiştir.



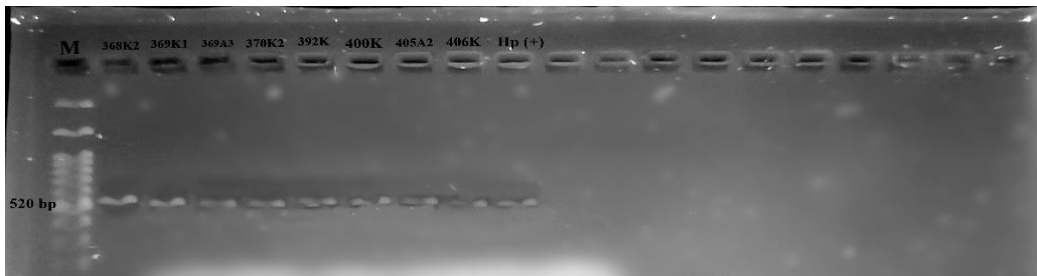
Şekil 4.8. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarının total DNA'sı ve *H. pylori* 16 s rDNA gen bölgesi için spesifik primerlerin kullanıldığı Nested- PCR'ın ardından ürünlerin agroz jelde görüntülenmesi (M: Moleküler ağırlık standardı)



Şekil 4.9. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarının total DNA' sı ve *H. pylori* 16S rDNA gen bölgesi için spesifik primerlerin kullanıldığı Nested- PCR'ın ardından ürünlerin agroz jelde görüntülenmesi (M: Moleküler ağırlık standardı)



Şekil 4.10. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarının total DNA' sı ve *H. pylori* 16S rDNA gen bölgesi için spesifik primerlerin kullanıldığı Nested- PCR'ın ardından ürünlerin agroz jelde görüntülenmesi (M: Moleküler ağırlık standardı)

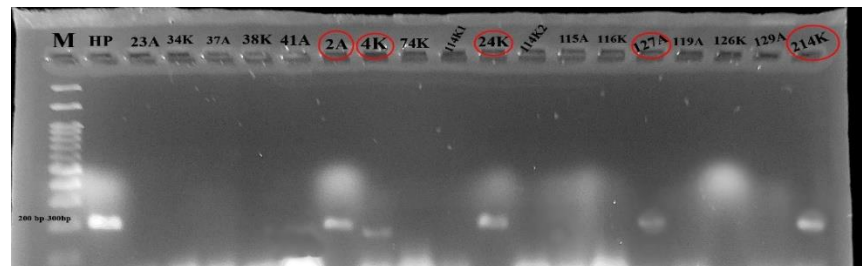


Şekil 4.11. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarının total DNA' sı ve *H. pylori* 16 s rDNA gen bölgesi için spesifik primerlerin kullanıldığı Nested- PCR'ın ardından ürünlerin agroz jelde görüntülenmesi (M: Moleküler ağırlık standardı)

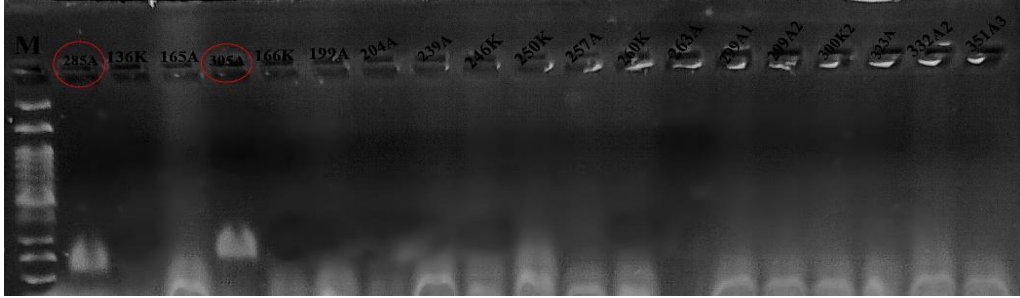
4.5 *Candida* Türlerinden İzole Edilen Total DNA'ların *H. pylori* Virülans Faktörlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin Spesifik Primerler İle Amplifikasyonu

4.5.1 *vacA* geninin amplifikasyonu:

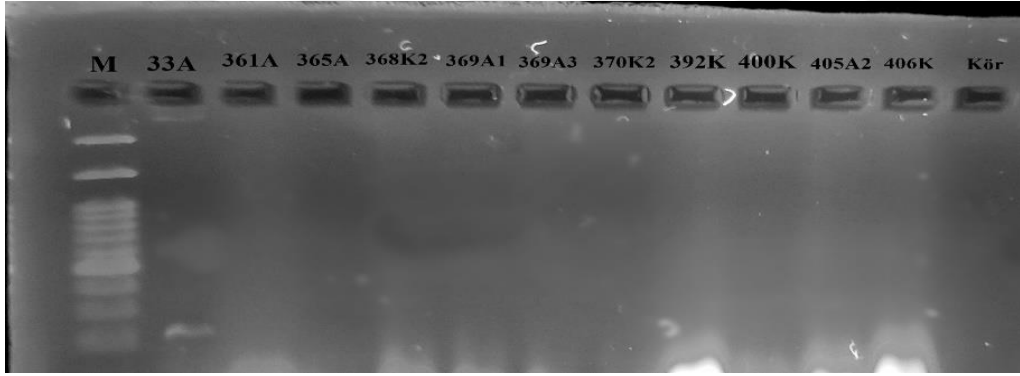
İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* türlerinden izole edilen total DNA'lar spesifik primerler ile amplifikasyona tabi tutulmuş ve *H. pylori*'ye özgü virulans genlerinden *vacA* geninin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla *H. pylori*'nin *vacA* geninin s1/s2 allelinin 259-286 bp'lik fragmentinin amplifikasyonu VAI-F: 5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3' ve VAI-R: 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3' primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *H. pylori*'nin *vacA* geninin m1/m2 allelinin 567-642 bp'lik fragmentinin amplifikasyonu VAG-F: 5'-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3' ve VAG-R: 5'-GCGTCAAAATAATTCCAAGG-3' primerleri kullanılarak Nested PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda 2A, 4K, 24K, 33A, 127A, 214K, 285A, 305A kodlu *Candida* sp. izolatlarında *vacA* geninin s1/s2 alleli tespit edilirken, hiçbir izolatta *vacA* geninin m1/m2 alleli tespit edilmemiştir. *vacA* geninin s1/s2 allelinin Nested PCR ile amplifikasyonunun agaroz jel elektroforezi sonuçları Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarında *H. pylori*'nin virulans genlerinden *vacA* geninin s1/s2 allelinin Nested PCR ile amplifikasyonunun ardından ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Moleküler ağırlık standardı)



Şekil 4.13. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarında *H. pylori*'nin virulans genlerinden *vacA* geninin s1/s2 allelinin Nested PCR ile amplifikasyonunun ardından ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Moleküler ağırlık standardı)



Şekil 4.14. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarında *H. pylori*'nin virulans genlerinden *vacA* geninin s1/s2 allelinin Nested PCR ile amplifikasyonunun ardından ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Moleküler ağırlık standardı)

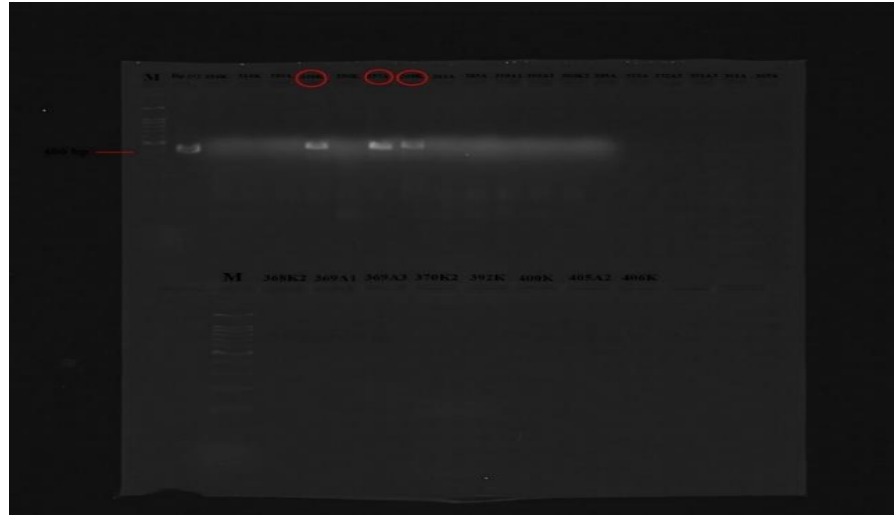
4.5.2 üreAB gen bölgesinin amplifikasyonu:

İçerisinde endofungal *H.pylori* barındıran *Candida* türlerinden izole edilen total DNA'larda *H.pylori*'nin virulans genlerinden üreAB geninin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla üreAB gen bölgesinin 406 bp'lik fragmentinin amplifikasyonu 2 forward primer F1: 5'-AACGAATTCAAAAAAGCCGTTAGCGTGAAA-3' , F2: 5'-GTTTCCATGGCGCTAAAAGCGATGACAACT-3' ve 1 reverse primer 5'-GCAGGATCCACGCTAAGATTGTTTTAA-3' kullanılarak Nested PCR gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda 4K, 37A, 38K, 41A, 246K, 257A,

260K kodlu *Candida* izolatlarında (7 izolat) *üreAB* geni tespit edilmiştir. *üreAB* geninin amplifikasyonunun agaroz jel elektroforezi sonuçları Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.15. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarında *H. pylori*'nin virulans genlerinden *üreAB* geninin Nested PCR ile amplifikasyonunun ardından ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Moleküler ağırlık standardı)

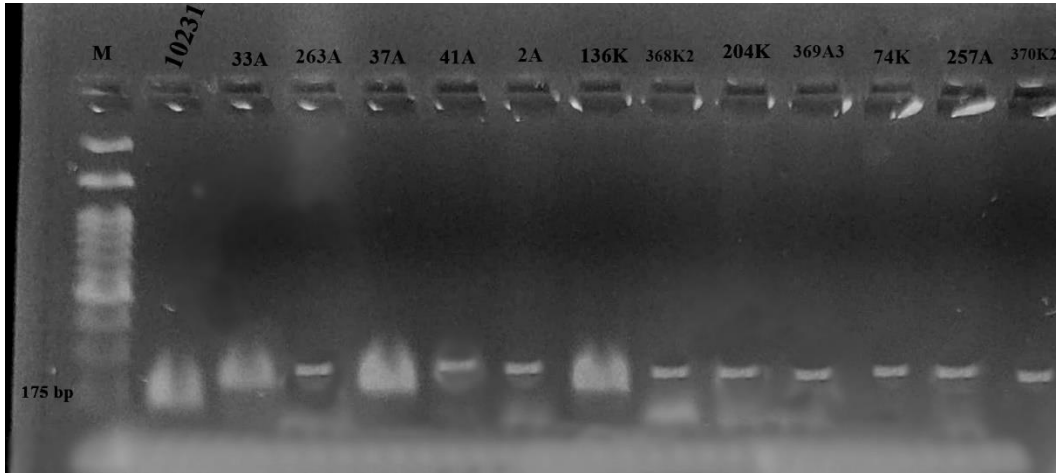


Şekil 4.16. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarında *H. pylori*'nin virulans genlerinden *üreAB* geninin semi- Nested PCR ile amplifikasyonunun ardından ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Moleküler ağırlık standardı)

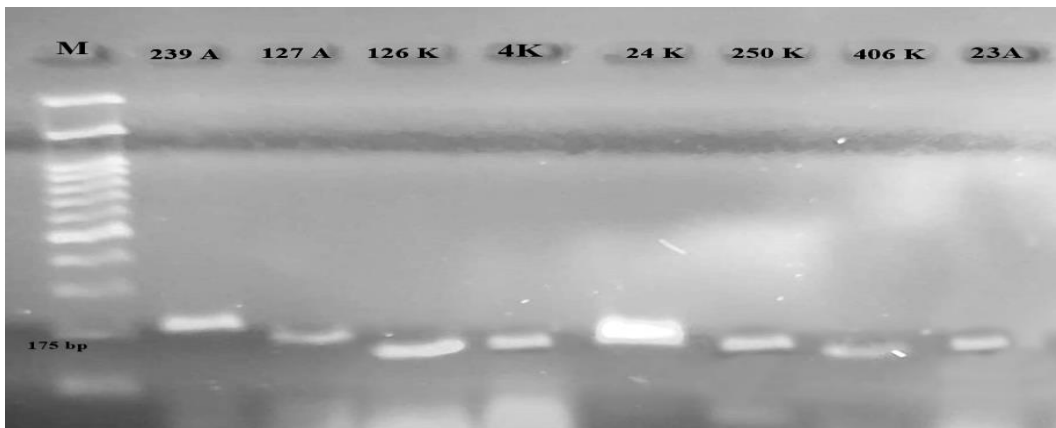
4.6 İçerisinde Endofungal *H. pylori* Barındıran *Candida* Türlerine Ait Total

DNA'ların *C. albicans* Spesifik Primerler ile Amplifikasyonu

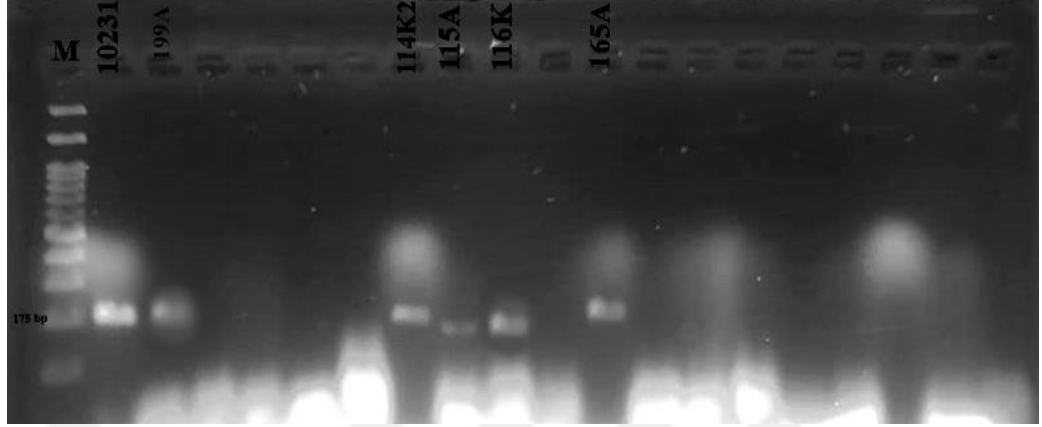
Chrom agar *Candida* ortamında yeşil koloni oluşturan, *C. albicans* olarak yorumlanan ve içerisinde endofungal *H. pylori* barındıran 25 izolatın tür tanısını doğrulamak için *C. albicans* species- specific PCR yapılmıştır. Agaroz jel elektroforezi görüntüleri Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



Şekil 4.17. *C. albicans* species- specific PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (Pozitif örnek: 10231, M:Moleküler ağırlık standardı)



Şekil 4.18. *C. albicans* species- specific PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (M:Moleküler ağırlık standardı)



Şekil 4.19. *C. albicans* species- specific PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (M:Moleküler ağırlık standardı)

2A, 4K, 23A, 24K, 33A, 37A, 41A, 74K, 114K2, 115A, 116K, 126K, 127A, 136K, 165A, 199A, 204K, 239A, 250K, 257A, 263A, 368K2, 369A3, 370K2, 406K kodlu izolatların *Candida albicans* olduğu *C. albicans* species-specific PCR ile doğrulanmıştır. Kalan 23 izolatın tanınması için 26S PCR (1 izolat) ve ITS PCR (22 izolat) gerçekleştirilmiş olup ürünler sekans analizine gönderilmiştir. Sekans analizi sonucunda çalışmada içerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida*'lardan 2A, 4K, 23A, 24K, 33A, 34K, 37A, 38K, 41A, 74K, 114K1, 114K2, 115A, 116K, 126K, 127A, 129A, 136K, 165A, 166K, 199A, 204K, 214K, 239A, 246K, 250K, 257A, 263A, 305A, 368K2, 369A3, 370K2, 400K, 406K kodlu izolat *Candida albicans*; 119A kodlu izolat *Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata*); 260K, 285A, 299A1, 299A2, 300K2, 323A, 332A2, 351A3, 361A, 365A, 369A1, 392K, 405A2 kodlu izolat *Candida tropicalis* türleri olarak saptanmıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. İzole edilen *Candida* izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması, accession numaraları, vac A geni s1/s2 alleli varlığı , vacA geni m1/m2 alleli varlığı, üreAB gen varlığı

<i>Candida</i> sp. izolat kodu	<i>Candida albicans</i> species-specific PCR	ITS gen bölgesi	Accession numarası	26S gen bölgesi	Accession numarası	vacA geni s1/s2 alleli varlığı	vacA geni m1/m2 alleli varlığı	üreAB gen varlığı
2A	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	+	-	-
4K	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	+	-	+
23A	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-
24K	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	+	-	-
33A	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	+	-	-
34K	-	<i>Candida albicans</i>	PP919057	-	-	-	-	-
37A	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	+
38K	-	<i>Candida albicans</i>	PP919274	-	-	-	-	+
41A	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	+
74K	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-
114K1	-	<i>Candida albicans</i>	PP919276	-	-	-	-	-
114K2	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-
115A	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-
116K	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-
119A	-	<i>Nakaseomyces glabratus</i>	PP923722	-	-	-	-	-
126K	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-
127A	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	+	-	-
129A	-	<i>Candida albicans</i>	PP919273	-	-	-	-	-
136K	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-
165A	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-
166K	-	<i>Candida albicans</i>	PP919338	-	-	-	-	-
199A	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-
204K	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-
214K	-	<i>Candida albicans</i>	PP919340	-	-	+	-	-

Tablo 4.3 devam

<i>Candida</i> sp. izolat kodu	<i>Candida albicans</i> species-specific PCR	ITS gen bölgesi	Accession numarası	26S gen bölgesi	Accession numarası	vacA geni s1/s2 alleli varlığı	vacA geni m1/m2 alleli varlığı	üreAB gen varlığı
239A	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-
246K	-	<i>Candida albicans</i>	PP930637	-	-	-	-	+
250K	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-
257A	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	+
260K	-	-	-	<i>Candida tropicalis</i>	PP989382	-	-	+
263A	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-
285A	-	<i>Candida tropicalis</i>	PP930732	-	-	+	-	-
299A1	-	<i>Candida tropicalis</i>	PP919339	-	-	-	-	-
299A2	-	<i>Candida tropicalis</i>	PP930638	-	-	-	-	-
300K2	-	<i>Candida tropicalis</i>	PP919342	-	-	-	-	-
305A	-	<i>Candida albicans</i>	PP919356	-	-	+	-	-
323A	-	<i>Candida tropicalis</i>	PP930639	-	-	-	-	-
332A2	-	<i>Candida tropicalis</i>	PP930642	-	-	-	-	-
351A3	-	<i>Candida tropicalis</i>	PP934672	-	-	-	-	-
361A	-	<i>Candida tropicalis</i>	PP919343	-	-	-	-	-
365A	-	<i>Candida tropicalis</i>	PP919358	-	-	-	-	-
368K2	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-
369A1	-	<i>Candida tropicalis</i>	PP930725	-	-	-	-	-
369A3	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-
370K2	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-
392K	-	<i>Candida tropicalis</i>	PP930727	-	-	-	-	-
400K	-	<i>Candida albicans</i>	PP989379	-	-	-	-	-
405A2	-	<i>Candida tropicalis</i>	PP934743	-	-	-	-	-
406K	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-

4.7 *Candida* Türlerinden Endofungal *H. pylori* Suşlarını Kültüre Etme

Çalışmaları

Çalışma kapsamında mide biyopsi örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinden endofungal *H. pylori* izolasyonu yapılamamıştır.

4.8 İçerisinde Endofungal *H. pylori* Barındıran *Candida* İzolatlarının

Antifungal Duyarlılık Testleri:

İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarının amfoterisin B ve flukonazole karşı antifungal duyarlılık testleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.4. *Candida* izolatlarının antifungal duyarlılık testi sonuçları

İzolatlar ve Antifungal Ajanlar	Dirençlilik %	Duyarlılık %	MİK aralığı	Ortalama MİK değeri	MİK ₅₀	MİK ₉₀
<i>Candida albicans</i> (n=34)						
Amfoterisin B	%44 (n=15)	%56 (n=19)	16 µg/ml - 64 µg/ml	55, 57 µg/ml	64 µg/ml	64 µg/ml
Flukonazol	%15 (n=5)	%85 (n=29)	2 µg/ml-64 µg/ml	31,7 µg/ml	24 µg/ml	64 µg/ml
<i>Candida tropicalis</i> (n=13)						
Amfoterisin B	%46 (n=6)	%54 (n=7)	64 µg/ml	64 µg/ml	64 µg/ml	64 µg/ml
Flukonazol	-	%100 (n=13)	4 µg/ml-64 µg/ml	19,69 µg/ml	16 µg/ml	64 µg/ml
<i>Nakaseomyces glabratus</i> (<i>C. glabrata</i>) (n=1)						
Amfoterisin B	-	%100 (n=1)	64 µg/ml	-	-	-
Flukonazol	-	%100 (n=1)	64 µg/ml	-	-	-

Çalışmada 48 izolat için gerçekleştirilen MİK testi sonucundaki MİK aralıkları, ortalama MİK değerleri, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo 4.4.'de gösterilmiştir. *Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata*) olarak tanımlanan sadece 1 izolat olduğu için bu izolatin sadece MİK değeri tabloda belirtilmiştir. Amfoterisin B'nin tüm isolatlar için 24. Saatteki MİK₅₀ değeri 64 µg/ml olarak bulunmuştur. Flukonazol'ün *C. albicans* isolatları için 24. Saatteki MİK₅₀ değeri 24 µg/ml, *C. tropicalis* isolatları için 24. Saatteki MİK₅₀ değeri 16 µg/ml olarak bulunmuştur.

Flukonazolün *C. albicans* ATCC 10231 izolatu için 24. Saatteki MİK 50 değeri ≥ 16 µg/ml'dir. *Candida albicans* isolatlarının %44'ü amfoterisin B'ye karşı dirençliken, % 56'sı duyarlıdır. *Candida albicans* isolatlarının % 15'i flukonazole karşı dirençliken, % 85'i duyarlıdır. *Candida tropicalis* isolatlarının %46'sı amfoterisin B'ye karşı dirençliken, %54'ü duyarlıdır. *Candida tropicalis* isolatlarının hepsi flukonazole karşı duyarlıdır. İzole edilen *Candida glabrata* amfoterisin B ve flukonazole karşı duyarlıdır.

4.9 İstatistiksel Analiz Sonuçları

Çalışmada analize alınan 233 hastanın %40,3 'ünün mide biyopsi örneklerinden *Candida* türlerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. 233 hastanın midesinin antrumundan alınan biyopsi örneklerinin % 32,2'sinden *Candida* türleri izole edilmiştir. 233 hastanın midesinin korpus bölgesinden alınan biyopsi örneklerinin % 25,3'ünden *Candida* türleri izole edilmiştir. *Candida* izolasyonu gerçekleştirilen bireylerin, % 15,9'unda maya içerisinde endofungal *H. pylori* bulunmaktadır. Antrum bölgesinden alınan mide biyopsi örneklerinde *Candida* izolasyonu gerçekleştirilen bireylerin % 10,3'ünün, bu bölgeden alınan biyopsiden izole edilen mayasının içerisinde endofungal *H. pylori* bulunurken, korpus bölgesinden alınan mide biyopsi örneklerinde *Candida* izolasyonu gerçekleştirilen bireylerin %9'unun , bu bölgeden alınan

biyopsiden izole edilen mayasının içerisinde endofungal *H. pylori* bulunmaktadır.

Mide biyopsi örneklerinden *Candida* türlerinin izolasyonu ve mide biyopsi örneklerinin *H. pylori* varlığı açısından histopatolojik olarak incelenmesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0,05$). *Candida* spp. içerisinde *H. pylori* varlığı ve mide biyopsi örneklerinin histopatolojik incelemesinde *H. pylori* varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamaktadır ($p>0,05$). Bireylerin midelerinin antrum bölgesinden alınan biyopsi örneklerinin *H. pylori* varlığı açısından histopatolojik incelemeleri sonucu ve daha önce *H. pylori* eradikasyon tedavisi alıp almadığı durumu istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Antrumdan izole edilen *Candida* türleri içerisinde endofungal *H. pylori* varlığı ve antrumdan alınan mide biyopsi örneklerinin *H. pylori* varlığı açısından histopatolojik incelemesi sonucu istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Bireylerin sigara kullanımı ve korpustan alınan mide biyopsi örneklerinin *H. pylori* varlığı açısından histopatolojik incelemesi sonucu istatistiksel olarak anlamlıdır. ($p<0,05$).

Çalışmada ÖGD yapılma nedenleri reflü, disfaji, atrofik gastrit, dispepsi, epigastrik ağrı, gis kanama, ülser, kronik ishal, malignite tarama, demir eksikliği anemisi, MALTOMA olarak belirlenmiştir. Çalışmada analize alınan hastaların daha önce *H. pylori* eradikasyon tedavisi alıp almadığı ve ÖGD yapılma nedenleri arasında anlamlı ilişki bulunmamaktadır ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ökaryotik hücrelerin bakteriyel istilası, enfeksiyon biyolojisindeki ana araştırma alanlarından biridir. Bakteriler konukçu hücreleri istila etmek için farklı stratejiler kullanmaktadır. Bu etkileşimler oldukça karmaşıktır ve etkileşimin türü bakteriye, konukçuya ve çevresel faktörlere bağlıdır (Peleg vd., 2010; Frey-Klett vd., 2011; Braga vd., 2016; Deveau vd., 2018). Bitkiler, hayvanlar, böcekler ve nematodlar da dahil olmak üzere ökaryotik organizmalarda yaşayan bakteriler üzerine çeşitli çalışmalar rapor edilmiştir (Hoerauf vd., 2000; Gil vd., 2004; Tapanila, 2005; Ryan vd., 2008).

Bakterilerin ökaryotik mikroorganizmalar olan funguslarla etkileşime girdiği bilinmektedir. Son yıllarda bakteriyel-fungal etkileşimler arasında en dikkat çekici olan birlikteliklerden endofungal birliktelik konusunda ilgi artmıştır. Yapılan çalışmalarda ökaryotik hücreler olan funguslar içerisinde endofungal bakterilerin yaşadığı tespit edilmiştir. Arbusküler mikorizal funguslarda (Glomeromycota) ve bunların sporlarında yaşayan endofungal bakteriler ilk kez 1970'lerde Bakteri Benzeri Organizmalar (BLO'lar) olarak rapor edilmiştir (Mosse, 1970). Bu bakteri benzeri organizmalar kültüre edilemedikleri için tanılamaları yapılamamıştır. Kültürden bağımsız yöntemlerin geliştirilmesiyle bu endofungal bakterileri tespit etmek ve karakterize etmek mümkün hale gelmiştir. Daha sonraki çalışmalarda, endofungal bakteri *Burkholderia rhizoxinica*'nın vertikal ve horizontal transmisyonu kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir (Partida-Martinez vd., 2005; Partida-Martinez vd., 2007; Partida-Martinez vd., 2008; Lackner vd., 2009; Sun vd., 2019).

Ökaryotik organizmalar olan fungal hücreler içerisinde yaşayan endofungal bakteriler uzun yıllardır bilinmektedir ve bu alandaki raporlar

genellikle çevresel örneklerden izole edilen funguslar içerisinde yaşayan endofungal bakteriler ve ürettikleri sekonder metabolitler üzerine yoğunlaşmıştır (Partida-Martinez vd., 2005; Partida-Martinez vd., 2007; Partida-Martinez vd., 2008; Lackner vd., 2009; Lackner vd., 2011; Birol ve Günyar, 2021; Günyar vd., 2022). Klinik örneklerden izole edilen funguslar ve funguslar içerisinde yaşayan endofungal bakterilere dair sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Funguslar içerisinde yaşayan endofungal bakterilerin patojen türler olabileceği göz önüne alındığında bakterilerin fungal hücrelerden dışarıya salınması durumunda insan sağlığı açısından oldukça önem arz etmektedir. Klinik açıdan önemli endofungal birliktelikleri oluşturan mikroorganizmaların tespit edilmesi tedavi stratejileri açısından önemlidir.

Mayalar, çevresel streslere karşı iyi adapte olabilme kabiliyetine sahip oldukça sofistike mikroorganizmalardır. *Candida* genusu üyeleri, normal insan mikrobiyotasında en yaygın olarak bulunan türlerden biridir ve ağız mukozası, deri, gastrointestinal bölge, ürogenital bölge gibi nişleri kolonize etmektedir. Bununla birlikte, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde veya kronik hastalıkları olan kişilerde *Candida* mayası patojenik hale gelerek kandidiyazis olarak isimlendirilen enfeksiyonlara neden olmaktadır (Santos vd., 2020). Bu cins içerisinde en sık fırsatçı enfeksiyonlara neden olan tür *Candida albicans*'tır. *C. glabrata*, *C. auris* ve *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* gibi türlerde halk sağlığına yönelik tehdit oluşturmaktadır (Lamoth vd., 2018; Pappas vd., 2018). *C. albicans*, insan vücudunda bulunabilen ve aynı zamanda belirli çevresel rezervuarlarda da yaşayabilen bir mayadır. Antibiyotiklerin neden olduğu bozukluklar, bağışıklık sistemi anormallikleri, mikrobiyomdaki değişiklikler ve/veya mukokutanöz bariyerin bütünlüğündeki değişiklikler *Candida* türlerinin fırsatçı bir patojen haline

gelmesine neden olmaktadır (McCarty ve Pappas, 2016; Ofulente vd., 2019; Zhai vd., 2020).

Aseptomatik kadınların yaklaşık %20 ila %30'unda kültüre bağımlı yöntemlerle ve yaklaşık %65'inde moleküler yöntemlerle vajinal nişte *C. albicans* kolonizasyonu tespit edilmiştir (Drell vd., 2013). Enfeksiyon semptomatik olduğunda vulvovajinal kandidiyazise neden olmaktadır ve hastalığın %80 ila %92'si *C. albicans*'tan kaynaklanmaktadır (Ceccarani vd., 2019).

Candida türleri konukçu nişinde çeşitli bakteri türleriyle etkileşime girmektedir. Bakteriler ve *Candida* türlerinin etkileşime girdiği en uygun nişlerden biri insan vücududur. Bu zamana kadar yapılan çalışmalar *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Pseudomonas* türleri ve *Candida* arasında olan ilişkilere odaklanmaktadır (Silverman vd., 2010; Ovchinnikova vd., 2012; Ovchinnikova vd., 2013; Beaussart vd., 2013).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bazı endofungal bakterilerin ökaryotik hücreler olan mayaların membrana bağlı vakuollerinin içinde yaşayarak hücre yapılarını koruyup hayatta kalmaya devam ettiği ve bu şekilde kendilerini gelecek nesillere aktarabildikleri rapor edilmiştir (Siavoshi vd., 2003; Salmanian vd., 2008; Brown vd., 2012; Saniee vd., 2013a; Saniee vd., 2013b; Siavoshi vd., 2013; Matamala-Valdés vd., 2018; Sánchez-Alonzo vd., 2020; Heydari vd., 2020). Bu birlikteliğe en güzel örnek *Helicobacter pylori* bakterisinin *Candida* mayalarının membrana bağlı vakuollerinin içinde endofungal olarak yaşadığı birliktelik verilebilmektedir. *Candida* spp.; yüksek sıcaklıklara, alternatif karbon kaynaklarına, reaktif oksijen türlerine, hücre duvarı stresörlerine ve çeşitli pH aralıkları gibi stresli koşullara son derece dirençli olduğundan *H. pylori*'yi bu olumsuz koşullara karşı koruyan alternatif bir konukçu olarak hizmet etmektedir. Bu sayede

mayalar *H. pylori*'nin çoğalması için besin sağlamaktadır ve bakterinin çevreye ve insandan insana yayılması için aracı olabilmektedir. (Siavoshi vd., 2003; Salmanian vd., 2008; Brown vd., 2012; Saniee vd., 2013a; Saniee vd., 2013b; Siavoshi vd., 2013; Matamala-Valdés vd., 2018; Sánchez-Alonzo vd., 2020).

H. pylori gram negatif, spiral, kamçılı, mikroaerofilik bir bakteridir. *H. pylori* insan midesini kolonize ederek gastrit, peptik ülser gibi patolojilere ve gastrik adenokarsinom ve mide mukozasıyla ilişkili lenfoid dokunun B hücre lenfoması (MALTOMA) gibi malignitelere neden olan bir bakteridir (Abadi ve Ierardi 2019; Sanchez-Alonso vd., 2021). *C. albicans*'da gastrointestinal sistemi kolonize edebilmektedir. Her iki organizmada gastrointestinal sisteme iyi adapte olabilmektedir. Ülser olmayan dispepsi, mide ülseri ve duodenum ülseri gibi üst gastrointestinal sistem hastalıklarının analiz edildiği bir çalışmada *Candida* ve *H. pylori* varlığı ile mide ülseri gelişimi arasında bir ilişki olduğu ve hastalığın patogeneğinde bu mikroorganizmalar arasında sinerjik ilişkinin önemli olduğuna dikkat çekilmiştir (Karczewska vd., 2009; Massarrat vd., 2016). *H. pylori* ve *C. albicans* arasındaki etkileşimler; endofungal birliktelik, adezyon veya karışık biyofilmlerin oluşumu aracılığıyla antibiyotiklerin ve elverişsiz ortamın öldürücü etkisine karşı direnci arttırabilmektedirler. Ardından yayılmayı ve kolonizasyonu teşvik edebilir ve hastalıkların oluşumu ve gelişimini etkileyen virülans faktörlerini uyarabilirler.

H. pylori, insanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilen ajanlardan biri olarak büyük tıbbi öneme sahiptir. Zamani ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği dünya çapında 73 ülkeyi kapsayan çalışmada; *H. pylori*'nin gelişmekte olan ülkelerde yaşayanların 1/2'sinden ve gelişmiş ülkelerde yaşayanların 1/3'ünden fazlası dahil olmak üzere küresel insan nüfusunun

%44'ünden fazlasını enfekte ettiği vurgulanmıştır (Zamani vd., 2018; Kotilea vd., 2019; Boyana vd., 2023) *H. pylori* enfekte kişilerin %80-90'ı asemptomatik olmasına rağmen, bazı ciddi hastalık riskleri taşımaktadır. Örneğin *H. pylori* eradike edilmediğinde meydana gelebilecek olan mide kanseri, dünya çapında kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir ve *H. pylori*, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından en güçlü kanserojenlerden biri olarak kabul edilmektedir (Violeta vd., 2018).

H. pylori enfeksiyonu çoğunlukla çocukluk döneminde edinilmektedir ve sıklıkla yaşam boyu devam etmektedir (Ailloud vd., 2021). *H. pylori*'nin eradikasyonu (tedaviden en az 4 hafta sonra *H. pylori* tespiti için tekrarlanan testlerden elde edilen negatif sonuçlar) mümkün olmakla birlikte, esas olarak bakteriyel direnç nedeniyle yıllar içinde eradikasyon başarısı sürekli olarak azalmaktadır (Hu vd., 2020). Enfeksiyonu ortadan kaldırmak için farklı karma tedavi rejimleri kullanılmıştır; bu tedavi rejimleri genellikle mide pH'ını arttırmak için bir proton pompası inhibitörü (PPI) veya (daha yakın zamanda) vonoprazan, iki veya üç antibakteriyel ajan, bazen bizmut eklenmesini içermektedir (Pellicano vd., 2018; Hu vd., 2020; Graham vd., 2018).

Eradikasyon rejimlerinde farklı kombinasyonlarda en sık kullanılan antibiyotikler amoksisilin, metronidazol, klaritromisin, tetrasiklin ve levofloksasindir. Karmaşık tedavi rejimlerine rağmen antibiyotik direnci, eradikasyon şimdiye dek başarısızlığının ana nedeni olarak gösterilmiştir. *H. pylori*'nin antibiyotiklere direnci çoğunlukla kromozomal olarak kodlanan mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Ancak akış sistemleri, membran geçirgenliğindeki değişiklikler ve biyofilm oluşumu nedeniyle de direncin ortaya çıkabildiği düşünülmektedir (Zanotti ve Cendron, 2019; Fauzia vd., 2020; Tshibangu-Kabamba ve Yamaoka, 2021).

H. pylori eradikasyonunda kullanılan antibiyotiklerin bakterinin kokoid morfolojisi gibi morfolojik ve fizyolojik adaptasyonlarını tetikleyerek *H. pylori* için stres faktörleri olarak hareket edebileceği gösterilmiştir (Bury-Moné vd., 2006; Parreira vd., 2011). Bakterideki morfolojik değişikliğin (kokoid morfoloji) direnç, enfeksiyonun yayılması ve antibiyotik tedavisinden sonra enfeksiyonun tekrarlaması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Estibariz vd., 2019)

H. pylori ile mücadelede eradikasyon başarısızlığının nedenlerini belirlemek önemlidir. Daha önce başarısızlık nedenleri olarak antibiyotik direnci, yüksek bakteri yükü, tedaviye düşük uyum, yüksek mide asiditesi ve sitokrom P450 2C19 polimorfizmi (CYP2C19) gibi birçok faktör önerilmiştir. Ancak bazı başarısızlık durumları bu faktörlerle açıklanamamaktadır (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; International Agency for Research on Cancer, 1994; Tacconelli vd., 2018; Parra-Sepúlveda vd., 2019).

.Eradikasyondaki başarısızlığın nedenlerinden birinin *H. pylori*'nin hücre içi fakültatif doğası olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan bazı in vivo ve in vitro çalışmalarda, *H. pylori*'nin gastrik epitel hücreleri, makrofajlar ve dentrik hücreler gibi bağışıklık hücrelerinde, amipler ve *Candida* mayaları gibi çeşitli ökaryotik hücreler içerisinde barınabileceği gösterilmiştir (Siavoshi vd., 2003; Salmanian vd., 2008; Brown vd., 2012; Saniee vd., 2013a; Saniee vd., 2013b; Siavoshi vd., 2013; Matamala-Valdés vd., 2018; Sánchez-Alonzo vd., 2020; Heydari vd., 2020).

H. pylori'nin kendisini ökaryotik hücrelerin içerisine saklaması “internalizasyon” olarak isimlendirilmektedir. Bu davranış bakterilerin ökaryotik hücreleri istila ettiği bir aktivitedir. Internalizasyon sayesinde, bakteri vücutta yok edilmekten kaçarak, hayatta kalmaya devam edip

çoğalabilmektedir. Bu nedenle konukçu, bakteriyi içerisinde barındırarak uzun süre taşıyabilmektedir (Maidan vd., 2008; Thewes vd., 2008). Böylece *H. pylori*'nin kendisini, çevresel pH'daki değişikliklere karşı veya onu yok etmek için kullanılan antibiyotik tedavilerine karşı "hayatta kalma stratejisi" geliştirdiği düşünülmektedir. (Momynaliev vd., 2013; Donofrio vd., 2015; Weerasekera vd., 2016). *Candida* spp. ve *H. pylori* arasındaki bu endofungal birlikteliğin *H. pylori*'nin eradikasyon başarısızlığının en önemli nedenlerinden biri olabileceği göz önünde tutulması gereken bir durumdur.

Özel fonksiyonları olan hücre içi zara bağlı organellerin gelişimi, ökaryotik hücrelerin evriminde kritik bir olaydır. Organel gelişimi ile prokaryotlarda meydana gelen besinlerin hücre dışı sindiriminden, ilkel ökaryotik hücrelerde hücre içi sindirime geçiş gerçekleşmiştir (Cavalier-Smith, 2002). Hücre içi organeller arasında sindirim vakuolü olan lizozom; açlık, otofaji, ksenofaji gibi zaman zaman kendi hücre içeriklerini parçalamak için özelleşmiştir. Buna göre, vakuol biyogenezi ökaryotik hücrelerin iki hayati hedefe ulaşılmasını sağlamak için meydana gelmiştir. Bunlar beslenme stresine karşı hayatta kalma ve istilacı mikroorganizmalara karşı korumadır. Bu özellikler ökaryotlara; yeni keşfedilmiş çeşitli nişlerde yer alma yeteneği kazanma, adaptasyon gibi avantajlar sağlamıştır (Levine, 2005).

Çeşitli raporlarda tek hücreli ökaryotların besin maddeleri olarak ilk olarak prokaryotları kullandıkları gösterilse de, hücre içi bakterilerin çevresel stresten ve konukçu sitoplazmasının antimikrobiyal savunma stratejilerinden kaçmak için membrana bağlı bir boşlukta kendini hücreler içine saklaması (internalizasyon) ve sekestrasyonlarını (depolanma) indüklemeyi öğrendiklerini açıklayan raporlar da bulunmaktadır. Bakteriler konukçada parazitik ve mutualistik olarak hayatta kalmalarını sağlayan mekanizmalar ile donatılmıştır (Dyall ve Johnson, 2000; Levine, 2005).

Hücre içi endofungal bakteriler ökaryotik hücreler içindeki membrana bağlı vakuollerde yerleşerek, hayatta kalmak ve çoğalmak için uygun bir niş yaratmışlardır. Hücre içi yaşayan, ökaryotik hücrelerin kalıcı veya geçici endosimbiontları haline gelen birçok endofungal bakteri bulunmaktadır (Siavoshi vd., 2003; Partida-Martinez vd., 2005; Partida-Martinez vd., 2007; Salmanian vd., 2008; Partida-Martinez vd., 2008; Lackner vd., 2009; Lackner vd., 2011; Saniee vd., 2013a; Saniee vd., 2013b; Siavoshi vd., 2013; Matamala-Valdés vd., 2018; Siavoshi vd., 2019; Birol ve Günyar, 2021; Günyar vd., 2022; Sánchez-Alonzo vd., 2020; Heydari vd., 2020). Ökaryotik fungal konukçunun bakteriyel invazyonunun biyolojik öneminin detayları ve bakterinin vakuol içerisindeki yerleşimi açıklanmayı beklemektedir. Bununla birlikte, bakterilerin hücre içi replikasyonunun, konukçu hücreyi tahrip etmeyen düşük oranlı ve sınırlı gen ekspresyonu ile gerçekleştiği düşünülmektedir (Corsaro vd., 1999; Kumar ve Valdivia, 2009; Siavoshi vd., 2019). Ökaryotik hücre vakuolündeki endofungal birliktelik vakuolün korunması ve her iki ortağın hayatta kalması açısından önemlidir. Fungal vakuol, konukçu kolonizasyonunu ve patojenik fungus türlerinin enfeksiyonunu desteklemede rol oynamaktadır (Dyall ve Johnson, 2000). Örneğin; insan patojeni *C. albicans*'ta vakuol, dokuya yayılan hif formunun üretimi sırasında dinamik morfolojik değişimlere uğramaktadır ve bu organel virülans için gereklidir. Fungus vakuolü tipik olarak hücresel makromoleküllerin parçalanmasında, besinlerin depolanmasında ve stres toleransında önemli rollere sahip büyük bir organeldir. Son zamanlarda yapılan birçok çalışma, bu organelin hem memeli hem de bitki patojeni fungusların konukçu istilasını desteklemede çok önemli bir rol oynadığını açıkça ortaya koymuştur. İnsan patojeni *C. albicans* ile yapılan çalışmalar; vakuolün stres toleransı, polarize hifal büyüme ve virülans için çok önemli olduğunu göstermiştir. *C. albicans*'ın hifal büyümesi doku hasarını kolaylaştırır, fagositik hücrelerden kaçmayı sağlayabilir ve virülans için

gereklidir. Dolayısıyla *C. albicans* vakuolü patogenezi iki düzeyde destekleyebilir: (1) düşman konukçuda hayatta kalmak için gereken stres direncini teşvik etmek; (2) dokuya invazif hifal büyümeyi desteklemek (Palmer, 2011).

Maya vakuolü, mayanın canlılığı için temel bir organeldir. Hücre içi moleküllerin bozulmasında, besinlerin depolanmasında ve stres toleransındaki büyük rolleri vardır. Hücre içi endofungal bakteriler içinde sofistike bir niş olarak hizmet edebilmektedir. Ökaryotik hücrelerin vakuolü hücre-içi sindirimin yanında, endofungal bakterilerin hayatta kalması için elverişli koşullar sağlayan, besin maddelerinin depolanması gibi ek rollere sahiptir. Hücre içi endofungal bakterilerin, korundukları ve besin maddelerine ulaşabilecekleri ve çoğalabilecekleri kendi vakuolar nişlerinin oluşumunu indükledikleri görülmektedir (Siavoshi vd., 2019).

Farklı mayaların vakuolü üzerinde yapılan çalışmalar, bu organelin moleküllerin sindirimine ek olarak, besinlerin sınıflandırılması, taşınması ve yeniden dağıtılması gibi diğer önemli işlevlere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Aynı zamanda kalsiyum, fosfat ve yüksek konsantrasyonda amino asitlerin depolandığı yerdir (Armstrong, 2010). Ayrıca vakuolde pH ve ozmotik düzenleme, iyon homeostazı ve sitoplazmik detoksifikasyon meydana gelmektedir. Vakuoller maya hücresi hacminin önemli bir kısmını (% 10-20) işgal ettiğinden; sayılarını, büyüklüklerini ve konumlarını değiştirerek maya hücresinin çevresel streslere karşı yanıt vermesini sağlayabilmektedir. Otofagosomlarla karşılaştırıldığında, bakteri içeren vakuollerin önemli ölçüde daha büyük olduğu ve esas olarak sitoplazmik maddelerden ziyade bakteri içerdiği gösterilmiştir (Nakagawa vd., 2004). Buna göre, tüm bu uygun özelliklere sahip maya vakuolü, bakteriler için sofistike bir sığınak görevi görebilir, böylece yok olmak yerine hayatta

kalmalarını ve büyümelerini arttırmaktadır (Kirkegaard vd., 2004; Shintani ve Klionsky, 2004).

Maya vakuolünün içinde *H. pylori* canlıdır ve ökaryotik hücrelerde solunum patlaması (respiratory burst) sırasında oluşan oksijen metabolitlerini detoksifiye etmek için peroksiredoksin, tiyol peroksidaz ve makrofajlarda fagolizozom füzyonunu yıkmak için üreaz ve vacA proteinlerini eksprese ettiği rapor edilmiştir (Schwartz ve Allen, 2006). *H. pylori*'nin ökaryotik hücrelerin vakuolüne yerleşip hayatta kalmak için güçlü araçlarla donatıldığı ileri sürülmüştür. Bu bilgiler *H. pylori* hücrelerinin maya vakuolü içerisinde mikroskopik olarak gözlemlenmesi ve ileriki nesil mayalarda bakteri genlerinin saptanmasıyla doğrulanmıştır (Saniee vd., 2013a; Saniee vd., 2013b). Raporlar, birçok hücre içi bakterinin, zara bağlı vakuollerini korumak ve hücre içi ortaklığı teşvik etmek üzere belirli proteinleri ifade etmek için evrimleştiğini göstermektedir (Siavoshi vd., 2019).

Mayaların içerisinde yaşayan endofungal bakterilerin araştırılması son yıllarda popüler hale gelmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalar genellikle *Candida*, *H. pylori* ve *Staphylococcus* türlerini içermektedir (Siavoshi vd., 2003; Salmanian vd., 2008; Saniee vd., 2013a; Saniee vd., 2013b; Siavoshi vd., 2013; Matamala-Valdés vd., 2018; Siavoshi vd., 2019; Sánchez-Alonzo vd., 2020; Sánchez-Alonzo vd., 2020; Heydari vd., 2020). Bakteri-maya endofungal birlikteliğine dair çalışmalar aşağıdaki bölümde özetlenecektir.

Siavoshi ve arkadaşları'nın 2005 yılında yaptığı bir çalışmada ağız boşluğundan izole edilen mayalarda *Helicobacter pylori*-spesifik genler araştırılmıştır. 18 maya, içerisinde yaşayan bakteri benzeri cisimlerin (BLB) varlığı açısından mikroskopik olarak incelenmiştir. İncelenen 18 mayanın hepsinin içinde BLB'ler tespit edilmiştir. Ağız boşluğundan izole edilen mayaların total DNA'sında *H.pylori*'ye spesifik cagA genin varlığı

araştırılmıştır. 18 mayanın 15'inde *H. pylori*'ye spesifik *cagA* geni tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda doğada bol miktarda bulunan ve bireylerin mukozal yüzeylerinde gelişebilen mayaların, *H. pylori*'nin rezervuarı ve taşıyıcısı olarak hizmet edebileceği öngörülmüştür (Siavoshi vd., 2005).

Salmanian ve arkadaşları 2008 yılında ağız boşluğundan izole edilen mayaların *H. pylori* için rezervuar görevi görebileceğine dair bir çalışma yapmışlardır. *H. pylori*'ye karşı uygulanan antimikrobiyal tedavinin başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olan durumun, bakterinin kendisini maya hücresi içerisinde saklayarak uygulanan tedaviye direnç gösterdiği yönünde yorumlamışlardır. Bu bilgiler ışığında çalışmada oral mayalarda kültürlenemeyen *H. pylori* varlığı, mayaların total DNA'larında vakuolize sitotoksin A (*vacA* geni *s1s2* alleli) ve *ureAB* genlerinin hedeflenmesiyle değerlendirilmiştir. Yapılan mikroskopik inceleme sonucunda BLB'lerin tespit edildiği içerisinde *H. pylori* olduğundan şüphelenilen 13 oral mayadan DNA ekstrakte edilmiştir. *vacA* geni *s1s2* alleli ve *ureAB* genleri 13 mayanın DNA'sından amplifiye edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları mayada hücre içi *H. pylori* bulunuşunu kanıtlamıştır. Bu endofungal ilişki, *H. pylori*'nin ağız boşluğundaki kalıcılığını açıklayabilmektedir. Sonuç olarak midenin; ağız boşluğunun kalıcı sakinleri olan *H. pylori* bakterileri tarafından yeniden aşılana bileceği ve insan popülasyonları arasında enfeksiyonun yayılmasına neden olabileceği düşünülmektedir (Salmanian vd., 2008).

Saniee ve arkadaşları 2013 yılında yaptığı bir çalışmada immunofloresan teknikler kullanarak oral ve gastrik örneklerden izole edilen *Candida* mayasının vakuolünün içindeki *H. pylori*'nin lokalizasyonunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada hızlı hareket eden hücre içi canlı *H. pylori* hücreleri ileri ki nesil mayaların içerisinde de gözlemlenmiştir (Saniee vd., 2013a).

Sanjee ve arkadaşları 2013 yılında maya vakuolü içinde *H.pylori* oluşumuna ilişkin önceki çalışmalarını destekleyici bir çalışma daha yapmıştır. Bu çalışma da oral ve gastrik örneklerden izole edilen mayalarda *H. pylori*'ye özgü proteinleri western blotlama ile saptamışlardır ve intravakuolar *H.pylori*'nin canlılığını doğrulamışlardır (Sanjee vd., 2013b).

Siavoshi ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı başka bir çalışmada oral ve vajinal örneklerden izole ettikleri mayalarda hücre içi *H.pylori* varlığı ve mayaların bakteriyel transmisyonundaki olası rollerini incelemişlerdir. Anne adaylarından 39 oral ve 30 vajinal maya olmak üzere toplamda 69 maya, bebeklerden 7 oral maya (6/46 vajinal doğum, 1/43 sezeryan doğum) tanımlanmıştır. Mayaların içerisinde yaşayan hücre içi BLB'leri gözlemek için ışık ve floresan mikroskopisi gerçekleştirilmiştir. Mayaların total DNA'larında *H. pylori*'ye özgü genler araştırılmıştır. Ayrıca annelerde *H. pylori* enfeksiyonunun tespiti için üre nefes testi (UBT) yapılmıştır ve bebeklerin dışkılarında *H. pylori* antijenlerinin saptanması için dışkı antijen testi (SAT) gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda oral mayalar daha çok normal doğumla dünyaya gelen yeni doğanlardan izole edilmiştir. Annelerin vajinal mayalarında *H. pylori* genlerinin sıklığı, annelerin oral mayalarına göre anlamlı derecede daha yüksektir. *H. pylori* genlerinin vajinal mayalarda ve yeni doğanların oral mayalarında görülmesi, annelerin vajinal mayalarında *H. pylori* genlerinin tespit edilmesiyle annelerde UBT + sonuçları arasında anlamlı bir ilişki görülmüştür (Siavoshi vd., 2013c).

Matamala-Valdés ve arkadaşları yeni doğanların dışkısında ve bu yaş grubunun ağız boşluğunu kolonize eden mayalarda *H. pylori* varlığına dair kanıtları güçlendirmek amacıyla bu konuda bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmanın amacı oral mayalarda hücre içi *H. pylori*'yi tanımlamak ve yeni doğan dışkılarında bakteri antijenlerini tespit etmektir. Çalışmada

bebeklerden oral sürüntü ve mekonyum örnekleri alınmıştır. Mayaların tür tanımlamaları fenotipik ve genotipik yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Mayalar floresan ve ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Mekonyumda *H. pylori* antijeninin tespiti gerçekleştirilmiştir ve mayaların total DNA'ları kullanılarak *H. pylori*'ye özgü genler (16S rRNA, *cagA*, *vacA* s1a, *vacA* s1b, *vacA* s2, *vacA* m1, *vacA* m2 ve *dupA*) amplifiye edilmiştir. Sonuç olarak hücre içi *H. pylori* yeni doğanların ağzından izole edilen *Candida glabrata* türü mayada tespit edilmiştir. Bu çalışma yeni doğanlardaki hücre içi *H. pylori* varlığını kanıtlamıştır (Matamala-Valdés vd., 2018).

Tavakolian ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı bir çalışmada *C. albicans* vakuolü içerisindeki *Staphylococcus*'un lokalizasyonu araştırılmıştır. Direkt immunofloresans (DIF) teknik ile mayanın vakuolü içinde bakteriyel lokalizasyonu tespit etmek için floresein-izotiyosiyanat (FITC)-etiketli antikorlar kullanılmıştır. Staphylococcaceae-spesifik prob kullanılarak FISH analizi gerçekleştirilmiştir ve immunofloresan tekniği sonuçlarının doğrulaması gerçekleştirilmiştir. Stafilokok proteinlerini hedefleyen western blotlama yapılmıştır. Western blotlama sonuçları, stafilokok proteinlerine benzer olarak 57.5 ve 66 kDa moleküler ağırlığa sahip proteinlerin, maya protein havuzunda saptanmıştır. *Candida* içinde stafilokok proteinlerinin ve genlerinin tespiti maya vakuolündeki hücre-içi bakterilerin varlığını göstermiştir (Tavalokian vd., 2019). Floresan etiketli oligonukleotid problar veya antikorlar, hücre-içi endofungal bakterilerin tanımlanması ve lokalizasyonu için spesifik, güçlü araçlar olarak kullanılmıştır. Yeterli ribozoma sahip aktif bakterilerin floresans problarla tespit edilebileceğine dair raporlar bulunmaktadır. Ölü bakteriler, rRNA'sı olmayanlar, aç veya uykuda olanlar floresan problarla tespit edilememektedir. Bakteriler- ve mayalar arasındaki endofungal birlikteliğine dair yapılan çalışmalarda anne ve yavru maya hücrelerinin vakuollerinde

floresan ışımların tespit edilmesi, hücre-içi endofungal bakterilerin fizyolojik olarak aktif ve replikatif olduğunu, yeni nesil mayalara aktarıldığını göstermektedir (Amaan vd., 1995; Christensen vd., 1999).

Sánchez-Alonzo ve arkadaşları Concepción Üniversitesi (Şili) öğrencilerinden izole edilen oral mayaların içinde *H. pylori* varlığını tespit etmek amacıyla çalışma yapmışlardır. 72 oral örnek toplanmıştır. 24 örnekte (%33.3) oral maya tespit edilmiştir. En sık görülen tür *C. albicans* (%79.2) olup, bunu *C. dubliniensis* (%12.4), *C. krusei* (%4.2) ve *C. tropicalis* (%4.2) izlemektedir. 24 oral mayadan izole edilen DNA'larda *H. pylori* 16S rDNA gen bölgesinin varlığı araştırılmıştır. Sonuç olarak 24 mayanın 15'inde (%62.5) *H. pylori* 16S rRNA geni saptanmıştır. *H. pylori* barındıran mayaların bulunduğu 15 kişiden %81'inde mide rahatsızlığı olduğu bildirilmiştir. Çalışmanın sonuçları oral mayalarda *H. pylori*'nin hücre içi varlığı, bu mikroorganizmalar arasında *H. pylori* transmisyonunu ve gastrointestinal kanalda yeniden enfeksiyonu destekleyebilecek endofungal bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (Sánchez-Alonzo vd., 2020).

Sánchez-Alonzo ve arkadaşları 2021 yılında yaptığı çalışmada vajinal maya hücreleri içinde yaşayan hücre içi *H. pylori*'nin virulans genlerinin varlığını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda virulans genlerine sahip olan *H. pylori*'nin vajinal mayalarda saptanması bu patojenin vertikal geçişiyle birlikte risk teşkil ettiği sonucuna varılmıştır. (Sánchez-Alonzo vd., 2021).

Yang ve arkadaşlarının 2024 yılında yaptığı bir çalışmada gastrik biyopsi örneklerinden ve vajinal akıntıdan izole edilen *Candida* türlerinde hücre-içi *H. pylori* antijenlerinin ve genlerinin varlığı araştırılmıştır. Vajinal akıntı ve mide mukozasından toplam 59 vajinal *Candida* ve iki gastrik *Candida* suşu izole edilmiştir. 23 izolatın *H. pylori* 16S rDNA'sı pozitif, 12'si

cagA pozitif ve 21'i ureA pozitifdir. BLB'ler, *H. pylori* 16S rDNA açısından pozitif olan *Candida* hücrelerinde gözlemlenebilmiştir ve LIVE/DEAD BacLight Bakteriyel Canlılık kiti ile canlı olduğu belirlenmiştir. İmmünofloresan teknikler ile Floresein izotiyosiyanat (FITC)-etiketli antikorlar kullanarak *Candida* hücreleri içindeki *H. pylori* antijeni tespit edilmiştir (Yang vd., 2024).

Yapılan çalışmalarda görüldüğü üzere *Candida-H.pylori* arasındaki endofungal birlikteliği açıklığa kavuşturmak *H. pylori* eradikasyon tedavisine ışık tutmak açısından çok önemlidir. Ayrıca maya içerisinde yer alan bakteriyel çeşitliliğin araştırılması gerekmektedir. Çalışmamızda Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji kliniğine başvuran ve takip eden hekimi tarafından tıbbi açıdan özofagogastroduodenoskopi (ÖGD; Üst GİS Endoskopisi) işlem endikasyonu konulan 233 hastanın mide biyopsi örnekleri toplanmıştır. Örnek alınan hastaların ÖGD yapılma nedenlerinin atrofik gastrit, demir eksikliği anemisi, disfaji, dispepsi, epigastrik ağrı, GİS (Gastrointestinal sistem) kanama, kronik ishal, malignite tarama, MALTOMA, reflü, ülser olduğu tespit edilmiştir. Çalışmaya alınan 233 hastanın 94'ünün (%41) mide biyopsi örneklerinden *Candida* türleri izole edilmiştir.

Mide içerisindeki mikroorganizma yoğunluğu, mide asiditesine ve diğer fizyolojik faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak, mide içeriğinde yüksek miktarda hidroklorik asit bulunması nedeniyle mikroorganizma yoğunluğu oldukça düşüktür. Ancak, belirli bölgelerde farklı yoğunluklar gözlemlenebilmektedir. Midenin antrum bölgesi, korpus bölgesine göre daha az asidik bir ortam sunmaktadır. Korpus bölgesinde hidroklorik asit salgısı daha yoğundur, bu da mikroorganizmaların yaşamasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, genellikle korpus bölgesinde

mikroorganizma yoğunluğu oldukça düşüktür. Antrum bölgesi, pH seviyesi biraz daha yüksek olduğu için (yani daha az asidik olduğu için), bazı mikroorganizmaların hayatta kalması ve üremesi için daha uygun bir ortam sunmaktadır. Midenin antrum bölgesi, korpus bölgesine göre daha yoğun mikroorganizma barındırma potansiyeline sahiptir. Midenin farklı bölümlerindeki pH seviyelerinin ve fizyolojik özelliklerinin farklılıklarından kaynaklanmaktadır (Guyton ve Hall, 2006; Atherton ve Blasen, 2009; Yamada vd., 2009). Bizim çalışmamızda izole edilen *Candida*'ların %58'i midenin antrum bölgesinden alınan biyopsi örneklerinden izole edilmiştir. 94 hastanın midesinin antrum bölgesinden izole edilen *Candida* spp. izolatu sayısı 92 ve korpus bölgesinden izole edilen *Candida* spp. izolatu sayısı 67'dir. Her iki bölgeden toplamda 159 *Candida* spp. izole edilmiştir. 48 hastanın hem antrum hem korpus bölgesinden, 30 hastanın sadece antrum bölgesinden ve 16 hastanın sadece korpus bölgesinden olmak üzere 159 *Candida* izole edilmiştir. 46 hastanın mide biyopsi örneklerinden bir, 48 hastanın mide biyopsi örneklerinden birden fazla *Candida* izole edilmiştir. Saniee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada örnek alınan hastaların tamamında mide ülseri bulunmaktadır. Mide biyopsilerinden 5 gastrik maya oral örneklerden 6 maya izole edilmiştir (Saniee vd., 2013b). Chromagar *Candida* ortamında yapılan inceleme sonucunda bu mayaların *C.albicans*, *C.tropicalis* ve *Candida* spp. olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmadaki gastrik mayalar *C. albicans* ve *Candida* türlerini içermektedir. Fakat bu çalışmada maya izolasyonu için kaç mide biyopsi örneğinin kullanıldığı, mide biyopsi örneklerinin midenin hangi bölgesinden alındığı ve alınan hangi bölgeden maya izole edildiğine dair bir bilgi bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda mide biyopsi örnekleri midenin iki farklı bölgesinden alınmıştır. Mide bölgelerinin fizyolojik özelliklerinin farklı olabileceği göz önüne alındığında sonuçlarımız önemlidir. Ayrıca çalışmamız değerlendirmeye alınan hasta sayısı ve izolat sayısı bakımından oldukça zengindir. Aynı grubun yaptığı

başka bir çalışmada ise mide biyopsi örneğinden 1 gastrik maya izole etmişlerdir. Mide biyopsi örneğinin izole edildiği hastanın gastrik ülseri bulunmaktadır (Sanicee vd., 2013a). Bu çalışmada izole ettikleri 1 gastrik mayanın vakuolü içerisindeki *H.pylori*'yi immunofloresan tekniklerle saptamışlardır. Yang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya mide rahatsızlığı olan 42 kadın hasta ve doğum öncesi muayene yapılan 50 hamile kadın dahil edilmiştir. Mide hastalığı olan 42 kadın hastadan 27 mide biyopsi örneği ve 22 vajinal akıntı toplanmıştır. 7 hastanın hem vajinal hem mide biyopsi örneği, 15 hastanın sadece vajinal akıntı örneği, 20 hastanında sadece mide biyopsi örneği alınmıştır. Bu çalışmada örnekleme sayısı bakımından Sanicee ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmaya göre yüksek olsa da bizim çalışmamızdaki sayının altında kalmıştır. 2 hastadan 2 *Candida* spp. izole edilmiştir (Yang vd., 2024). Bu çalışmada analize alınan hastalardan çok az sayıda gastrik maya izole edilmiştir.

Mide asiditesi nedeniyle, mide içerisinde *Candida* varlığı oldukça nadirdir ve düşük seviyelerde bulunmaktadır. Mide asiditesinin azalması gibi durumlar, *Candida*'nın mide mukozasında kolonize olmasına yol açabilmektedir. Uzun süreli proton pompası inhibitörü (PPI) kullanımı, mide asiditesini azaltarak *Candida*'nın mide mukozasında kolonize olmasını ve böylece enfeksiyonlara neden olmasına yol açabilmektedir. *Candida*'nın mide üzerindeki etkileri, dispepsi (hazımsızlık), epigastrik ağrı (mide ağrısı) ve bulantı gibi belirtilerle ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca, *Candida*'nın mide mukozasında aşırı çoğalması, mukoza bütünlüğünü bozarak gastrit ve mide ülseri gibi durumlara yol açabilmektedir (Pappas vd., 2009). Çalışmamızda *Candida* izolasyonu gerçekleştirdiğimiz mide biyopsi örneklerini topladığımız hastaların %73'ü dispepsi, epigastrik ağrı ve malignite belirtileri ile kliniğe başvurmuştur. Sonuçlarımız *Candida* izolasyonu yaptığımız

hastaların ÖGD yapılma nedenleri *Candida*'nın mide üzerindeki etkisi sonucu ortaya çıkan belirtilerle uyumludur.

Candida mayalarının vakuolü içerisinde endofungal *H.pylori* varlığını araştırmak amacı ile FISH analizi gerçekleştirilmiştir. 159 *Candida* izolatında hücre-içi endofungal bakterilerin varlığının araştırılması amacıyla bakterilere özgü EUB338 prob ve endofungal *H.pylori* varlığını araştırmak amacıyla *H. pylori*'ye özgü Hpy prob kullanılarak eş zamanlı olarak FISH analizi gerçekleştirilmiştir.

FISH analizi moleküler biyoloji ve genetik araştırmalarda sık kullanılan bir moleküler tekniktir. FISH spesifik DNA ve RNA dizilerinin tespit edilmesi ve lokalizasyonunu belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Düşük bakteri yoğunluğunda bile sonuç alınabilen hassas bir tekniktir (Abdel-Moein vd., 2015). *H. pylori*'ye spesifik floresan etiketli (cy3) Hpy prob *H. pylori* DNA'sına bağlanır ve floresan mikroskobu altında bu bağlanmalar floresan ışımlar olarak kolayca tespit edilebilmektedir. Bu yöntem bakterinin tespit edilmesinin yanında antibiyotik direncinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu amaçla belirli direnç genlerini hedef alan proplar kullanılarak analiz gerçekleştirilir ve tedaviyi belirleyen veriler elde edilir. *H. pylori*'nin saptanmasında kültür yöntemi, serolojik testler vb. yöntemlere kıyasla FISH yöntemi daha hızlı sonuç vermektedir.

Candida izolasyonu gerçekleştirdiğimiz ortamlardan Chromagar *Candida* ortamında antimikrobiyal (kloramfenikol- 0,5 g/L) bulunmaktadır. Maya içerisinde yaşayan bakterinin antibakteriyel ajandan etkilenebileceği göz önüne alındığında aynı biyopsi örneğine ait hem MYGP-A ortamı hem de Chromagar *Candida* ortamından izole edilen *Candida* izolatlarının FISH analizi aynı zamanda gerçekleştirilmiştir. FISH analizi sonucunda her iki ortamdan da izole ettiğimiz mayaların içinde de hücre-içi bakterileri saptadık.

159 *Candida* izolatının 99 tanesinde hücre-içi endofungal bakteri tespit edilmiştir. İncelenen *Candida* izolatlarının sadece 48 (%31) tanesinde endofungal *H. pylori* tespit edilmiştir. 51 izolatta *H. pylori* tespit edilmemiştir. FISH analizi sonucunda *H. pylori* dışında bakteri içeren 51 izolat tez çalışması dışında başka çalışmalarda kullanılmak üzere stoklanmıştır. Çalışmaya 48 *Candida* izolatıyla devam edilmiştir.

Hpy-prob, *H. pylori*'nin ribozomal RNA'sına (rRNA) özgü dizilere bağlanan floresan işaretli bir oligonükleotid probudur. FISH tekniği, *H. pylori*'nin çeşitli biyolojik örneklerde, *Candida* vakuolü içerisinde endofungal olarak bulunduğu durumlarda bile tespit edilmesini sağlamaktadır. FISH analizi, özellikle *H. pylori*'nin kültür edilmesinin zor olduğu durumlarda veya antibiyotik tedavisi sonrasında bakteri yükünün düşük olduğu hastalarda büyük avantaj sağlamaktadır (Morak vd., 2012). Çalışmada cy3-etiketli Hpy prob kullanılmıştır. Floresan mikroskop altında yapılan inceleme sonucunda *H. pylori* hücreleri *Candida* vakuolü içerisinde sarı-yeşil floresan ışımlar olarak gözlenmiştir. Bakterilere özgü EUB338 prob ile gerçekleştirilen FISH analizinde vakuol içerisinde birden fazla ışımaya gözlenmesi maya vakuolünün belki aynı türde birden fazla bakteri, belki de farklı türde bakterileri içerdiğini göstermektedir. Maya vakuolü içerisindeki bakteriyel çeşitliliğin belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

İçerisinde *H. pylori* tespit edilen *Candida* türlerinin izole edildiği 37 hastadan 9 hastanın(%25) mide biyopsi örneklerinin *H. pylori* varlığı açısından histopatolojik inceleme sonucu pozitifdir. 37 hastadan 28 hastanın (%75) mide biyopsi örneklerinin *H. pylori* varlığı açısından histopatolojik inceleme sonucu negatiftir. Ancak bu 28 hastadan izole edilen *Candida* türleri içerisinde *H. pylori* tespit edilmiştir. Hastalar aslında *H. pylori* ile enfekte olmalarına rağmen *H. pylori* kendisini maya içerisine sakladığı için

histopatolojik incelemede saptanmamış olabilir. Bu bulgu bize *H. pylori* taraması yapılırken, midede bulunan *Candida*'lar içerisinde yaşayan *H. pylori*'lerde göz önünde bulundurulması gerektiğini düşündürmektedir.

İçerisinde *H. pylori* tespit edilen *Candida* türlerinin izole edildiği hastalardan 12 hasta (%32) daha önce *H. pylori* eradikasyon tedavisi alırken, 25 hasta (%68) daha önce bu tedaviyi almamıştır. Daha önce eradikasyon tedavisi almamış 25 hastanın mide biyopsi örneklerinin histopatolojik incelemesinde 8 hastada (%32) *H. pylori* tespit edilmiştir. Ayrıca daha önce *H. pylori* eradikasyon tedavisi alan 12 hastadan birinin (%8) mide biyopsi örneğinin *H. pylori* varlığı açısından histopatolojik incelemesi sonucunda *H. pylori* tespit edilmiştir.

Daha önce *H. pylori* tedavisi almış 11 hastanın mide biyopsi örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinde *H. pylori* tespit edilmiştir. Bu sonuçlar belki de bireylerin midelerinde bulunan *Candida*'lar içerisinde barınan *H. pylori* bilinmeyen koşullar altında mide ortamına salındığında bireyin tekrar bu bakteriyle enfekte olduğu ve şikayetlerinin tekrarladığı şeklinde yorumlanmıştır. Sonuçlarımız *H. pylori*'nin eradikasyonundaki başarısızlığın bakterinin endofungal yaşam stratejisini kullanmasından kaynaklanabileceğine dair bilgilerle uyumludur. Hiengrach ve arkadaşları *Candida*'nın tek başına mide hasarına sebep olup olmadığını araştırdığı bir çalışmada endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* 'ların oral yolla farelere aktarılmasıyla farelerde gastrit meydana getiemesine rağmen tek başına *Candida*'nın gastrite neden olmadığını rapor etmiştir (Hiengrach vd., 2022). İntravakuoler endofungal *H. pylori* mayadan dışarı salınarak, normal *H. pylori*'ye benzer şekilde gastriti tetikleyebilmektedir.

Endoskopi raporu sonuçlarına göre 2A kodlu izolatın izole edildiği hastaya eritematöz antral gastrit, 4K kodlu izolatın izole edildiği hastaya

normal üst GİS, 23A ve 24K izolatlarının izole edildiği hastaya eritematöz antral gastrit, 33A ve 34K izolatlarının izole edildiği hastaya eritematöz antral gastrit, 37A ve 38K izolatlarının izole edildiği hastaya eritematöz antral gastrit, 41A izolatının izole edildiği hastaya eritematöz antral gastrit, 74K izolatının izole edildiği hastaya hiatus hernisi (mide fıtığı), 114K1 ve 114K2 izolatlarının izole edildiği hastaya normal üst GİS, 115A ve 116K izolatlarının izole edildiği hastaya normal üst GİS, 119A izolatının izole edildiği hastaya intestinal metaplazi ve eritematöz antral gastrit, 126K izolatının izole edildiği hastaya eritematöz antral gastrit, 127A izolatının izole edildiği hastaya eritematöz antral gastrit, 129A izolatının izole edildiği hastaya intestinal metaplazi ve eritematöz antral gastrit, 136K izolatının izole edildiği hastaya eritematöz antral gastrit, 165A ve 166K izolatlarının izole edildiği hastaya normal üst GİS, 199A izolatının izole edildiği hastaya intestinal metaplazi ve eritematöz antral gastrit, 204K izolatının izole edildiği hastaya eritematöz antral gastrit, 214K izolatının izole edildiği hastaya normal üst GİS, 239A izolatlarının izole edildiği hastaya eritematöz antral gastrit, 246K izolatının izole edildiği hastaya normal üst GİS, 250K izolatlarının izole edildiği hastaya eritematöz antral gastrit, 257A izolatının izole edildiği hastaya normal üst GİS, 260K izolatlarının izole edildiği hastaya eritematöz antral gastrit, 263A izolatının izole edildiği hastaya kalkık eroziv antral gastrit, 285A izolatının izole edildiği hastaya atrofik korpus gastriti, eritematöz antral gastrit, ülser, 299A1, 299A2 ve 300K2 izolatının izole edildiği hastaya intestinal metaplazi ve eritematöz antral gastrit, 305A izolatının izole edildiği hastaya intestinal metaplazi, eritematöz antral gastrit, polipoid lezyon, 323A izolatının izole edildiği hastaya eritematöz antral gastrit, 332A2 izolatının izole edildiği hastaya eritematöz pangastrit, intestinal metaplazi, bulbit, 351A3 izolatının izole edildiği hastaya kalkık eroziv antral gastrit, 361A izolatının izole edildiği hastaya kalkık eroziv antral gastrit, 365A izolatının izole edildiği hastaya hiatus hernisi, eritematöz antral

gastrit, bulbit, 368K2 izolatının izole edildiği hastaya hiatus hernisi, kalkık eroziv antral gastrit, 369A1, 369A3 ve 370K2 izolatının izole edildiği hastaya eritematöz antral gastrit, 392K izolatının izole edildiği hastaya normal üst GİS, 400K izolatının izole edildiği hastaya eroziv antral gastrit, 405A2 ve 406K izolatının izole edildiği hastaya antrumda polip (hiperplastik polip) tanısı koyulmuştur. İçerisinde *H.pylori* bulunan *Candida*'ların izole edildiği hastalardan 21'nin endoskopi sonucundaki tanılarının eritematöz antral gastrit olduğu dikkat çekmektedir. Eritematöz antral gastrit, midenin antrum bölgesinin iltihaplanması ve bu bölgede kızarıklık meydana gelmesiyle karakterize edilmektedir. Eritematöz antral gastrite neden olan en önemli faktörlerden birinin *H. pylori* enfeksiyonu olduğu bilinmektedir. *H. pylori*, mide mukozasına yerleşerek iltihaplanmaya yol açmaktadır. Böyle eritematöz antral gastrite sebep olmaktadır. Tedavi edilmediği sürece mide mukozasının sürekli iltihaplanmasıyla kronik gastrite, sürekli iltihabın mide duvarına zarar vermesiyle ülser, ülserlerin mide mukozasında kanamaya neden olmasıyla mide kanamasına ve mide mukozasında doku kaybına ve hücre bozulmasına devamında ise mide kanserine neden olabilmektedir (Shah vd., 2021).

FISH analizinin ardından PCR tabanlı moleküler yöntemler kullanılarak *Candida* türleri içerisinde endofungal *H. pylori*'nin varlığı araştırılmıştır. İçerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarının total DNA' sı ve *H. pylori* 16S rDNA gen bölgesi için spesifik primerlerin kullanıldığı Nested- PCR ile amplifiye edilmiştir. Nested PCR, polimeraz zincir reaksiyonu tekniğinin bir modifikasyonudur. Düşük miktardaki DNA örneklerinin amplifikasyonu ve spesifikliğin artırılması amacıyla kullanılmaktadır. Nested PCR yöntemi 2 basamaklıdır. İlk basamakta dış primerler kullanılarak DNA amplifiye edilmektedir. İkinci basamakta, ilk basamakta elde edilen PCR ürünü dış primerler ile amplifiye

edilmektedir. Bu yöntem yüksek spesifiklik ve duyarlılık gerektiren DNA analizlerinde kullanılmaktadır (Calsamiglia vd.,1999). Böylece bu yöntemle çalışmamızda *Candida* türlerinden izole edilen total DNA'larda düşük miktardaki *H. pylori* DNA'sı saptanmıştır. Saniee ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışmada maya içerisinde yaşayan *H. pylori*'nin genleri klasik PCR yöntemiyle amplifiye edilmiştir. Çalışmada western blotlama yapılmıştır ve bunun sonucunda 3 oral (O1= *C.albicans*, O2= *Candida* sp., O3= *C. tropicalis*) ve 2 gastrik (G2= *Candida* sp. ,G4=*Candida* sp.) mayada *H. pylori* spesifik proteinler saptanmıştır. O1, O2 ve G2 kodlu izolatta 6 *H. pylori* spesifik protein, O3 ve G4 kodlu izolatta 4 *H. pylori* spesifik protein saptanmıştır. İncelenen 5 gastrik mayanın 4'ünde (G1, G2, G3, G4) , 6 oral mayanın 5 'inde (O1, O2, O3, O4a, O4b) *H. pylori*'ye spesifik 16S rDNA gen bölgesi saptanmıştır. Yang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gastrik örnekten izole ettikleri 2 *Candida* spp. içerisinde *H. pylori*'ye spesifik 16S rDNA gen bölgesi saptamışlardır. Bizim çalışmamızda 48 *Candida* izolatının hepsinde *H. pylori* 16S rDNA gen bölgesi saptanmıştır.

48 *Candida* izolatında *H.pylori*'ye özgü virulans genlerinden vacA geninin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla *H. pylori*'nin vacA geninin s1/s2 allelinin 259-286 bp'lik fragmentinin amplifikasyonu VAI-F: 5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3' ve VAI-R: 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3' primerleri kullanarak gerçekleştirilmiştir. *H. pylori*'nin vacA geninin m1/m2 allelinin 567-642 bp'lik fragmentinin amplifikasyonu VAG-F: 5'-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3' ve VAG-R: 5'-GCGTCAAATAATTCCAAGG-3' primerleri kullanarak Nested PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda 2A, 4K, 24K, 33A, 127A, 214K, 285A, 305A kodlu *Candida* sp. izolatlarında (8 izolat) vacA geninin s1/s2 alleli tespit edilirken, hiçbir izolatta vacA geninin m1/m2 alleli

tespit edilmemiştir. Saniee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mide biyopsi örneklerinden izole ettikleri 5 *Candida* izolatının 4'ünde vacA s1 genlerinin varlığını saptamışlardır. VacA s1 genotipi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gastrik malignitelere sebep olan ciddi klinik sonuçlarla ilişkilidir. Vakuolleştirici toksin da yüksek düzeyde inflamasyon ve gastrik mukozada epitel hasarına sebep olmaktadır ve bu da gastrik adenokarsinom riskini arttırmaktadır.

H.pylori'nin VacA toksininin en belirgin fonksiyonunun memeli hücrelerinde vakuolasyonu indüklemek olduğunu ileri süren raporlar bulunmaktadır (Cover ve Blanke, 2005). *H. pylori*, insan hücreleri üzerinde çok çeşitli etkilere neden olabilen bir toksin olan VacA'yı salgılamaktadır. VacA'nın ürettiği hücresel etkiler arasında endositik kompartmanların bozulması, mitokondriyal membran geçirgenliğinde azalma ve hücresel sinyal yollarının uyarılması yer almaktadır. VacA, epitel hücreleri, antijen sunan hücreler, fagositik hücreler, mast hücreleri ve T lenfositleri dahil olmak üzere çeşitli farklı hücre tiplerinin fonksiyonlarını modüle edebilmektedir. VacA plazma zarına bağlanır, hücreler tarafından içselleştirilir ve endositik kompartmanlarda veya mitokondride lokalize olabilmektedir. VacA'nın neden olduğu birçok hücresel etki, VacA'nın kanallar oluşturmak için membranlara yerleşmesiyle başlamaktadır. Yapılan bir hayvan modeli deneyi VacA'nın midede *H. pylori* kolonizasyonuna katkıda bulunduğunu göstermektedir. VacA'nın, in vitro T lenfositlerin aktivasyonunu ve çoğalmasını inhibe ettiği tespit edilmiştir. Çeşitli çalışmalar VacA'nın *H. pylori* ile ilişkili peptik ülserasyon ve mide adenokarsinomunun patogenezinde katkıda bulunduğunu göstermektedir. VacA'ya benzer şekilde, diğer birçok bakteri türü tarafından üretilen bakteriyel toksinler birden fazla hücresel etkiye sebep olabilmektedir. Bakteriler tarafından salgılanan toksinler, bakterilerin ökaryotik konukçularında kolonileşmesinde rol oynamaktadır ve

toksinler, çok sayıda bulaşıcı hastalığın patogeneze katkıda bulunmaktadır. (Cover ve Blanke, 2005).

VacA memeli hücre zarına yerleştikten sonra iyon kanalları üretir, hücrenin önemli bir bölümünü kaplayan büyük vakuollerin oluşumunu uyarmaktadır (Cover ve Blanke, 2005; Torres vd., 2005; Siavoshi vd., 2019). VacA'nın endozomal-lizozomal kompartmanlara yolculuk yaptığı ve küçük GTPaz Rab 7'ye bağlı bir mekanizma aracılığıyla vakuolizasyona neden olduğu ileri sürülmüştür. VacA ayrıca, katepsin gibi lizozomal hidrolazları etkileyerek lizozomların degradative kapasitesini de bozmaktadır. *H. pylori*'nin otofajiyi indüklemek için VacA'yı kullandığı ve çeşitli hücre içi bakterilere benzer şekilde otofajik yolu bozduğu, olgunlaşmasını engellediği ve hayatta kalmak ve replike olmak için bir barınak sağladığı görülmektedir. Bu durumun hücre içi endofungal bakteriler ve ökaryotik konukçu arasındaki simbiyotik ilişkinin geliştirilmesinde temel adım olabileceğini düşünülmektedir. (Johansson vd., 2005; Cover ve Blanke, 2005; Siavoshi vd., 2019).

Çalışmamızda 48 *Candida* izolatında *H. pylori*'ye özgü virulans genlerinden üreAB geninin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla üreAB gen bölgesinin 406 bp'lik fragmentinin amplifikasyonu 2 forward primer F1: 5'-AACGAATTCAAAAAAGCCGTTAGCGTGAAA-3' , F2: 5'-GTTTCCATGGCGCTAAAAGCGATGACAAC-3' ve 1 reverse primer 5'-GCAGGATCCACGCTAAGATTGTTTTAA-3' kullanılarak Nested PCR gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda 4K, 37A, 38K, 41A, 246K, 257A, 260K kodlu *Candida* izolatlarında (7 izolat) üreAB geni tespit edilmiştir. Saniee ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışmada mide biyopsi örneklerinden izole ettikleri 5 *Candida* izolatının 4'ünde üreAB geni varlığını saptamışlardır. Yang ve arkadaşlarının 2024 yılında yaptığı

çalışmada izole ettikleri 2 gastrik mayanın ikisinde de *ureAB* gen bölgesi saptanmıştır.

H. pylori'nin hayatta kalması için önemli olan kritik bileşenlerden biri üreaz enzimidir. Üreaz enzimi *ureAB* gen kümesi tarafından kodlanmaktadır. Bu genler arasında *ureA* ve *ureB* genleri, üreazın fonksiyonel aktivitesi için gereklidir. *ureA* yaklaşık 26 kDa boyutunda olan üreazın alfa alt birimini kodlamaktadır. Alfa alt birimi, aktif üreaz enziminin oluşumunda beta alt birimine bağlanarak kritik bir rol oynamaktadır. *ureB* Yaklaşık 61 kDa boyutunda olan üreazın beta alt birimini kodlamaktadır. Beta alt birim, alfa alt birimiyle birlikte üreyi hidrolize edebilen aktif üreaz enzimini oluşturmaktadır. Üreaz enzimi, üreyi amonyak ve karbondioksit parçalayan bir enzimdir. Bu reaksiyon, *H. pylori*'nin hayatta kalması için hayati önem taşır çünkü çevresel pH'ı artırarak bakteriyi mide asidik koşullarından korumaktadır. Bu reaksiyonda üretilen amonyak, mide asidini nötralize etmektedir ve bakterinin etrafında koruyucu bir tampon oluşturmaktadır. Üreaz enzimi, *ureA* ve *ureB* tarafından kodlanan alfa ve beta alt birimlerden oluşan bir nikel içeren metaloenzimden oluşmaktadır. Nikel iyonları, üreazın katalitik aktivitesi için esastır (Rutherford, 2014; Olivera-Severo vd., 2017; Debowski vd., 2017).

ureAB geni, *H. pylori*'nin mide mukozasında kolonizasyonu ve kalıcılığı için esastır. Üreaz aktivitesi sadece mide asidini nötralize etmekle kalmaz, aynı zamanda patojenin konukçu bağışıklık yanıtından kaçınma yeteneğine de katkıda bulunmaktadır. Üreaz tarafından üretilen amonyak epitel hücrelerine toksik etki gösterebilmektedir ve böylece hücre hasarına ve inflamasyona neden olabilmektedir. Bu inflamatuvar yanıt, *H. pylori* enfeksiyonunun bir belirtisidir ve gastrit ve peptik ülser gelişimi ile ilişkilidir. Üreaz aktivitesi *H. pylori*'nin mide mukozasında koruyucu bir alan

oluşturmasını kolaylaştırarak *H. pylori*'nin kronik bir enfeksiyonu kurmasına olanak tanımaktadır. Bu kronik enfeksiyon, mide kanseri riskinin artması da dahil olmak üzere uzun vadeli komplikasyonlara yol açabilmektedir (Rutherford, 2014; Olivera-Severo vd., 2017).

Candida spp. vakuolü içerisinde endofungal olarak yaşayan *H. pylori* arasındaki ilişkide de üreaz enziminin önemi bulunmaktadır. Üreaz enzimi, *H. pylori*'nin mide asidini nötralize ederek hayatta kalmasına ve çoğalmasına olanak tanırken, aynı zamanda *Candida*'nın gastrointestinal sistemdeki varlığını ve patojenitesini de etkileyebilmektedir. Hem *H. pylori* hem de *Candida*, biyofilm oluşturma kapasitesine sahiptir. Biyofilmler, mikroorganizmaların bir arada yaşadığı ve dış etkenlere karşı korunduğu kompleks yapılar olarak tanımlanmaktadır. *H. pylori*'nin üreaz aktivitesi, mide asidini nötralize ederek, *Candida* için daha uygun bir ortam yaratabilir ve biyofilm oluşumunu destekleyebilmektedir. Bu durum, her iki mikroorganizmanın da dirençli yapılar oluşturmaya ve uzun süreli enfeksiyonlara yol açmasına neden olabilmektedir. *Candida* türlerinin içerisinde endofungal olarak yaşayan *H. pylori* sayesinde patojenitesi artmakta ve tedavi rejimlerinde kullanılan antifungal ajanlara karşı direnç gösterdiği bilinmektedir. *H. pylori* ve *Candida*'nın birlikte var olması birbirlerinin hayatta kalma şansının artmasını sağlamaktadır (Chen vd., 2021).

Üreaz aktivitesi sonucu üretilen amonyak, hem *H. pylori*'nin hem de *Candida* türlerinin konukçu hücrelerde hasar oluşturmaya katkıda bulunabilmektedir. Amonyak sayesinde hasar gören epitel hücrelerine kolonizasyonun daha kolay olduğu bilinmektedir. Böylece *Candida* türleri bu hasarlı bölgelerde daha kolay kolonize olup enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *H. pylori* ve *Candida* türleri bağışıklık sisteminden kaçma

yeteneklerine sahiptir. *H. pylori*'nin üreaz aktivitesi, lokal pH'ı değiştirerek ve immün hücrelerin fonksiyonlarını etkileyerek bağışıklık yanıtını baskılayabilmektedir. *Candida* türleri de bağışıklık hücrelerini hedef alan enzimler salgılayarak ve hücre duvarını modifiye ederek bağışıklık sisteminden kaçabilmektedir. Bu ortak mekanizmalar, her iki patojenin de konukçuda daha uzun süre kalmasını sağlayabilmektedir (Heitman, 2014; Chen vd., 2021).

Çalışmada içerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarında *H. pylori*'nin virulans genlerinin saptanması önemlidir. Virulans özellikleri kodlayan bu genlerin varlığı organizmaların konukçuda enfeksiyon meydana getirmesi ve ileriki aşamada ciddi patolojilerle sonuçlanabilecek hastalıklara sebep olmasını desteklemektedir. Çalışmada izole edilen 4K kodlu izolatta çalışmada araştırılan her iki virulans geninin varlığı saptanmıştır. 4K kodlu izolatin izole edildiği hasta dispepsi şikayetiyle kliniğine başvurmuştur, aynı zamanda hastada ek olarak malignite (Over CA-takip) bulunmaktadır ve ilgili hekimi tarafından ÖGD işlemi yapılmasına karar verilmiştir. Endoskopi sonucunda hastanın normal üst GİS sahip olduğu belirlenmiştir. Bu hasta daha önce *H. pylori* eradikasyon tedavisi almıştır ve şuan ki mide biyopsi örneğinin *H. pylori* açısından histopatolojik inceleme sonucu negatif çıkmıştır. Histopatolojik incelemesi sonucu negatif çıktığı için hastaya *H. pylori* eradikasyon tedavisi önerilmemiştir. Fakat çalışmamızda bu hastadan izole ettiğimiz maya içerisinde *H. pylori* tespit edilmesi ve aynı zamanda bakterinin enfeksiyona neden olup ciddi patolojik hastalıklara sebep olması için önemli olan virulans faktörlerini kodlayan genlerin saptanması klinik açıdan çok önemlidir. *Candida* mayasının mide ortamında bilinmeyen koşullar altında bakterisini dışarıya salması durumunda, bireyin virulans özelliklere sahip patojen *H. pylori* ile enfekte olabileceği dikkate alınması gerekli bir konudur. Malignite tanısı almış bireylerde bağışıklık sistemi düşük

olduğu için patojen mikroorganizmalar çok ciddi enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Çalışmamız özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış, gastrointestinal sistemde kanser geçmişi olan bireylerde hastalığın tekrarlaması ve/veya ilerlemesi açısından bireylerin gastrointestinal sistemindeki mikroorganizmalarda endofungal gelişim mekanizmasının daha ayrıntılı şekilde araştırılması gerektiğine de dikkat çekmektedir.

Çalışmada içerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida*'lardan 2A, 4K, 23A, 24K, 33A, 34K, 37A, 38K, 41A, 74K, 114K1, 114K2, 115A, 116K, 126K, 127A, 129A, 136K, 165A, 166K, 199A, 204K, 214K, 239A, 246K, 250K, 257A, 263A, 305A, 368K2, 369A3, 370K2, 400K, 406K kodlu izolat *Candida albicans*; 119A kodlu izolat *Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata*); 260K, 285A, 299A1, 299A2, 300K2, 323A, 332A2, 351A3, 361A, 365A, 369A1, 392K, 405A2 kodlu izolat *Candida tropicalis* olarak saptanmıştır.

Candida türleri, özellikle *Candida albicans*, *Candida glabrata* ve *Candida tropicalis*, insan vücudunun çeşitli mukozal yüzeylerinde yaygın olarak bulunan fırsatçı patojenlerdir. Normalde, bu funguslar bağışıklık sistemi tarafından kontrol altında tutulmaktadır ve herhangi bir sorun yaratmazlar. Ancak, bağışıklık sisteminin zayıflaması, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı veya mide asiditesinin azalması gibi durumlar, *Candida* türlerinin aşırı çoğalmasına ve enfeksiyonlara yol açmasına sebep olmaktadır. Mide, yüksek asiditesi nedeniyle genellikle mikroorganizma yoğunluğu düşük bir ortamdır; ancak belirli durumlarda *Candida* türleri burada da çoğalabilmektedir (Pappas vd., 2009).

C. albicans, mide mukozasında varlığıyla gastrit ve peptik ülser gibi durumlara yol açabilmektedir. Özellikle bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda, *C. albicans* enfeksiyonları ciddi komplikasyonlara neden

olabilmektedir. *C. glabrata*, *C. albicans*'a göre daha az yaygındır, ancak antifungal tedavilere karşı daha dirençli olması nedeniyle tedavi sürecinde zorluklar yaratabilir. Bu fungusun mide mukozasında bulunması, özellikle yaşlı hastalarda ve immün yetmezlik durumlarında ciddi sorunlara yol açabilmektedir. *C. tropicalis* ise özellikle gastrointestinal sistem enfeksiyonlarına neden olabilen bir türdür ve yayılımı hızlıdır. *C. tropicalis* enfeksiyonları, özellikle nötropenik hastalarda daha sık görülmektedir ve sistemik enfeksiyonlara yol açabilmektedir (Sobel, 2006; Pappas vd., 2009).

C. albicans tek başına gastrite neden olamayabilir fakat, *H. pylori* kaynaklı gastritin *Candida* tarafından desteklendiğine dair raporlar bulunmaktadır (Karczewska vd., 2009; Massarrat vd., 2016; Chen vd., 2021). Hiengrach ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptığı bir çalışmada *Candida*'nın tek başına mide hasarına sebep olmadığını, endofungal *H. pylori* barındıran *Candida*'ların oral yolla farelere aktarılmasıyla farelerde gastrit meydana geldiğini rapor etmiştir (Hiengrach vd., 2022). İntravakuoler endofungal *H. pylori* mayadan dışarı salınarak normal *H. pylori*'ye benzer şekilde gastriti tetikleyebilmektedir. Tek başına *H. pylori*'nin neden olduğu gastritin şiddeti ile *Candida* içindeki *H. pylori*'nin neden olduğu gastritin şiddeti farklı değildir. Bu bulgu, *H. pylori* ve *Candida*'nın bir arada bulunmasıyla artan pro-enflamasyona ilişkin önceki raporlardan farklıdır. *H. pylori*'nin *Candida*'dan dışarıya salınmasından sonra *Candida*'nın pro-inflamatuar özelliklerini kaybettiği düşünülmektedir. Yani maya içerisinde *H. pylori* varken gastrit oluşumunu tetiklemektedir, bakteri yokken inflamatuvar özelliğini yitirdiği düşünülmektedir. *H. pylori*'nin *C. albicans* veziküllerinden salınmasının, Toll benzeri reseptörler, özellikle TLR4 ve TLR2 gibi çeşitli adaptör molekülleri aracılığıyla, mukozanın gastrik enflamasyonunu aktive eden enterositlerin pro-inflamatuar tepkisini arttırdığı düşünülmektedir (Hiengrach vd., 2022).

Endofungal bakteriler konukçu içinde hayatta kalmak için gerekli genleri içeren küçük genomlara sahiptir ve aynı zamanda konukçu için gerekli metabolitleri sağlamaktadırlar. Bu durumda, endofungal bakterilerin konukçularına yüksek düzeyde adapte oldukları bildirilmektedir. Ayrıca kalıcı veya zorunlu endofungal bakterilerin ökaryotik konukçuların içine milyarlarca yıl önce girmiş olabileceği düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda mide biyopsi örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinden endofungal *H. pylori* izolasyonu yapılamamıştır. Bulgularımız diğer çalışmalar ile uyumludur. *Candida* içerisinde bulunan *H. pylori*'nin izolasyonu daha önce yapılamamıştır. Bunun nedenleri endofungal bakterilerin konukçusu olan fungal hücreler içerisinde az sayıda bulunduğu ve tespit edilmesinin zor olduğu veya konukçuya sıkı bağımlılıkları nedeniyle kültürlenebilirliklerini yitirdikleri gösterilmiştir. Araştırmacılar maya içerisinde yaşayan hali hazırda tanımlanmayı bekleyen endofungal bakteriler için daha fazla ve geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiğini belirtmişlerdir. (Görtz ve Brigge, 1998; Cavalier-Smith, 2002). Bunun tersine, konukçuya alternatif girişleri olan, yeni ve geçici olan fakültatif endosimbiyontlar kültüre daha uygundur (Jargeat vd., 2004).

Candida-H. pylori endofungal birlikteliğinde, *Candida* içerisinde yaşayan *H. pylori* suşlarını kültüre etme çalışmalarında başarıya ulaşılamamıştır. Mide enfeksiyonu sırasında, *H. pylori* büyük ölçüde aktif olarak bölünen, spiral şekilli (sarmal) bir morfolojiye sahiptir. Bununla birlikte, *H. pylori*, bağırsak kanalına girdikten sonra, oradaki olumsuz anaerobik koşullarla mücadele edebilmek için canlı ancak kültürü yapılamayan /kültüre edilemeyen bir kokoid forma dönüşmektedir. Bu dönüşüm, aerobik koşullar ve antibiyotiklerin varlığı, uzun süre kültür gibi olumsuz koşullar altında da gözlenmiştir. Kokoid formun, standart laboratuvar yöntemleriyle in vitro olarak kültürü yapılamaz. Bununla birlikte,

bu hücrelerin canlı ve muhtemelen bulaşıcı olduğu form olarak kabul edilmiştir. Kokoid formlar, “canlı ama kültürü yapılamayan hücreler” olarak kabul edilirler. Bu formun *H. pylori*'nin uygun olmayan ortamlarda hayatta kalmasına izin veren uyku aşaması olduğu varsayılmıştır (Hirukawa vd., 2018). Bu bilgiler *H. pylori*'nin *Candida* hücreleri dışına çıkarıldığında canlı fakat kültüre edilemeyen forma dönüşebileceğinden kültüre edilemediğini düşündürmektedir.

Kokoid formu in vitro olarak kültürü yapılabilir olmasa da, aktif transkripsiyon ve translasyon yapabildiğine dair kanıtlar vardır. 2018 yılında yapılan bir çalışma da *H. pylori*'nin kokoid ve sarmal formunun yanında fragmentli formunun da olduğu tespit edilmiştir. Anaerobik ortam koşullarının morfolojik olarak değişikliğe neden olup olmadığı test edilmiştir. Yapılan çalışmada *H. pylori* ATCC 43504'ün bir mikroaerobik sıvı kültürü, anaerobik koşullar altında çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir ve bakteri morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile değerlendirilmiştir. *H. pylori* ayrıca kamçı benzeri, uzun filamentli yapıların varlığı açısından da değerlendirilmiştir. Bakterilerin uzunluk ve genişlikleri ölçülmüştür. Deneyin başlangıcında (0. Gün), sadece sarmal haldeki bakteriler gözlenmiştir. Hücreler 1 gün süreyle anaerobik koşullar altında inkübe edildiğinde, bakterilerin >%90 sarmal ve <%6 kokoid formda olduğu gözlenmiştir. Mikroskobik incelemede sarmal bakteri oranı 6. gün itibarıyla kademeli olarak %0'a düştüğü görülürken; kokoid form oranı 3. günde %64'e yükselmiştir ve ardından 7. günde %19'a düşmüştür. Parçalanmış şekilli (fragmentli) bakteriler de gözlenmiştir. Bu parçalanmış şekilli bakteri oranları zamana bağlı bir şekilde 3. günde %0, 5. günde %36 ve 7. günde %80'e yükselmiştir. Bu hücreler kabaca küre biçimindedir ve düz olmayan bir yüzeye sahiptir. Bu yeni morfolojiye fragmentli form adı verilmiştir. Bu sonuçlar, anaerobik koşulların kokoid form aracılığıyla *H. pylori*'nin

sarmaldan yeni tanımlanmış fragmentli forma morfolojik dönüşümünü indüklediğini göstermektedir. Daha önceki çalışmalar *H. pylori*'nin kokoid formunun kültürünün yapılabilirliğini tamamen kaybettiğini belirtmiş olsa da diğer çalışmalar in vitro ve in vivo olarak kokoid formundan geri kazanımlarını göstermiştir. Bu veriler, anaerobik koşullar altında inkübasyonun neden olduğu parçalanmış formda olan *H. pylori*'nin sarmal forma geri dönebileceğini göstermektedir (Hirukawa vd., 2018).

Bakteri-maya endofungal birlikteliğine dair yapılan çalışmalar sonucunda mayanın tıpkı Truva atı gibi davranarak bakteriyi stres koşullarından koruyarak hayatta kalmasını sağladığını ve bu şekilde bakterinin kendisini ileriki nesillere aktararak hayatta kalmaya devam ettiğini göstermektedir. *H. pylori*'nin gastrointestinal patolojik hastalıklarla ilişkili, tehlikeli ve klinik öneme sahip bir bakteri olduğu göz önüne alındığında bu bakterinin mide içerisinde bilinmeyen koşullar altında mayadan dışarıya salınımı durumunda insan sağlığı açısından tehlike teşkil edebilme konusu önem arz etmektedir.

Mikrobiyal ekologlar hiçbir organizmanın yalnız olarak yaşamadığını vurgulamaktadır. Tek hücreli olsa bile farklı organizmalar arasındaki etkileşim ve ilişkilerin önemi göz ardı edilemez. Bakteri (özellikle endofungal bakteriler) maya etkileşimleri hala belirsizliğini korumaktadır ve bu konu hakkında hala pek fazla şey bilinmemektedir (Nowack ve Melkonian , 2010; Frey-Klett vd., 2011; Bonfante ve Desiro, 2017; Mondo vd., 2017; Devau vd., 2018; Pawlowska vd., 2018; Álvarez-Pérez vd., 2019; Indu vd., 2021). Mayalar predasyon ve otofaji gibi çok çeşitli ilişkilere girmektedirler. Yapılan çalışmalar mayaların ve bakterilerin çoğu zaman aynı ortamda bir arada bulunduğunu, ancak etkileşimlerinin derinlemesine incelenmediğini göstermektedir. Fungal mikrobiyom çalışmaları, fungus konukçusundaki her

mikrobiyomun ne kadar farklı olduğunu göstermektedir. Mayaların endofungal bakterileri ile ilgili bazı araştırmalar halen devam ediyor olsa da, tespit edilen birlikteliklerin sayısı azdır. Bu tür birlikteliğe dair en eski raporlardan biri *Candida tropicalis* ve *Microbacterium* sp. arasındaki olası bir simbiyotik ilişkidir (Indu vd., 2021). *Rhodotorula mucilaginosa* mayasının *Pseudomonas stutzeri*'yi barındırdığı rapor edilmiştir. Bu maya-endobakteri sistemi, mayayı barındıran pirinç bitkisi ile etkileşime girmiştir; burada bu mikroorganizmalar toplu olarak nitrojen fiksasyonuna yardımcı olmaktadır (Sen vd., 2019).

Klinik örneklerin yanı sıra çevresel örneklerden, gıdalardan izole edilen mayalar içerisinde yaşayan endofungal bakterilere dair birkaç çalışma mevcuttur. Siavoshi ve arkadaşları insanlarda *H. pylori* enfeksiyonunu kontrol etmek için çevresel rezervuarın belirlenmesine dair bir çalışma yapmışlardır (Siavoshi vd., 2018). Bu çalışmada, bireylerden alınan oral sürüntüler (7), çiçekler ve meyveler (6), bal ve bal arıları (12), çeşitli örnekler (4) dahil olmak üzere toplamda 29 örnekten mayalar izole edilmiştir. İzole edilen ; 9 *Candida* izolatının 5'inde, 5 *Komagataella* izolatının 4'ünde, 4 *Pichia* izolatının 3'ünde, 2 *Cytobasidia* izolatının 2'sinde 2 *Hansenia* izolatının 2'sinde 1 *Meyerozyma* izolatında ve 3 sekanslanmamış mayanın 2 sinde *H. pylori* tespit edilmiştir. Çiçekler, meyveler, bal ve bal arılarından izole edilen farklı ozmotolerant maya türlerinin vakuollerinde *H. pylori* tespit edilmiştir. Bu örneklerde *H. pylori* pozitif mayaların görülme sıklığının yüksek olması, yüksek şeker içerikleriyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu mayaların nektarlara geçişini kolaylaştıran bal arıları gibi böcekler, mayaların ana rezervuarları olarak görev yapmaktadırlar ve korunmaları ve dağılmalarında önemli rol oynamaktadırlar. Buna göre, mayaların içindeki *H. pylori*, bal arıları tarafından şeker ve besin açısından zengin farklı ortamlara taşınabilmektedir. *H. pylori* pozitif mayaların doğada

dağılımında şeker açısından zengin ortamlar ve bal arıları önemli rol oynamaktadır (Siavoshi vd., 2018).

Siavoshi ve arkadaşları 2020 yılında yaptığı bir çalışmada şeker açısından zengin gıdalardan izole edilen maya izolatlarında hücre içi *H. pylori* ve *Staphylococcus* spp. varlığını incelemişlerdir. Çalışmada izole edilen mayalar *Candida*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Meyerozyma*, *Metschnikowia* ve *Wickerhamomyces* olmak üzere 7 cinsin üyeleri olarak tanımlanmıştır: PCR analizi sonucunda izole edilen 32 mayanın, % 53'ü *H. pylori*-pozitif, % 6'sı *Staphylococcus*-pozitif, % 18,7'si her ikisi için de pozitif ve %21,8'i her ikisi içinde negatiftir. Bu sonuçlar mayaların vakuollerinde birden fazla endofungal bakterinin var olabileceğini göstermiştir. Mayada *H. pylori* ve *Staphylococcus*'un birlikteliği sofistike bir hayatta kalma stratejisi iken, maya güçlü bir bakteri deposu görevi görmektedir (Siavoshi vd., 2020).

Endofungal bakterilerin kendilerini maya hücrelerinin içinden dışarıya salmasının yanında hangi koşullar altında kendilerini maya hücrelerinin içine sakladığı da büyük bir araştırma konusudur. Bu alanda daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. İnsan sağlığı açısından oldukça önem taşıyan *H. pylori*'nin kendini maya içerisine saklamasına neden olan faktörlere dair çalışmalar son yıllarda yapılan birkaç çalışmayla sınırlı kalmıştır ve mekanizma henüz netliğe kavuşmamıştır.

Son olarak çalışmada içerisinde endofungal *H. pylori* barındıran *Candida* izolatlarının amfoterisin B ve flukonazol antifungal ajanlarına karşı duyarlılık testleri gerçekleştirilmiştir. *Candida* türleri ve *H. pylori* arasındaki etkileşimler, özellikle mide mukozasında birlikte bulunması *Candida*'nın antifungal ajanlara karşı daha dirençli hale gelmesine katkıda bulunabilir mi sorusu, giderek artan bir ilgi görmektedir. Bazı çalışmalar, *Candida* ve *H.*

pylori'nin endofungal birlikteliğinin *Candida*'nın antifungal direncini artırabileceğini öne sürmektedir. Hem *Candida* hem de *H. pylori*, biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Biyofilmler, mikroorganizmaların yüzeylere yapışarak oluşturdukları koruyucu yapılar olup, antifungal ve antibiyotik tedavilere karşı direnç sağlamaktadır. *H. pylori*'nin varlığı, *Candida* biyofilmlerinin daha sağlam ve dirençli hale gelmesine katkıda bulunabilmektedir. *H. pylori*, mide mukozasında çeşitli enzimler ve toksinler salgılayarak mikroçevresini değiştirmektedir. Bu değişiklikler, *Candida*'nın daha elverişli bir ortamda hayatta kalmasını ve çoğalmasını sağlayabilmektedir. Örneğin, *H. pylori*'nin üreaz enzimi ile mide asiditesini nötralize etmesi, *Candida*'nın büyümesi için uygun pH seviyesini sağlayabilmektedir.

H. pylori bağışıklık yanıtı modüle ederek *Candida*'nın immün sistemden kaçmasına yardımcı olabilmektedir. Bu durum, *Candida* enfeksiyonlarının daha kronik ve tedaviye dirençli hale gelmesine neden olabilmektedir. *H. pylori* ve *Candida* arasında genetik materyal veya metabolit alışverişi olması durumunda, bu durumun *Candida*'nın antifungal ajanlara karşı dirençli hale gelmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Tobudic vd., 2010; Peters vd., 2010; Chen vd., 2021).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada mide biyopsi örneklerinden izole edilen ve içerisinde endofungal *H. pylori* barındıran türlerin çoğunluğunu *C. albicans* oluşturmaktadır. Bunu *C. tropicalis* ve *C. glabrata* izlemektedir. Türkiye’de maya içinde yaşayan endofungal bakterilere dair başka çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız ülkemizde bu alanda yapılacak olan çalışmalar için temel oluşturacaktır. Çalışmada mide biyopsi örneklerinden izolasyonunu gerçekleştirdiğimiz içerisinde endofungal *H. pylori* bulunan *Candida*’ların, içerisinde barındırdığı *H. pylori*’yi bilinmeyen koşullar altında mide ortamına salması durumunda bireyin tekrar bu bakteriyle enfekte olacağını ve belkide ciddi patolojilerle sonuçlanabilecek hastalıklara neden olacağına dikkat çekilmektedir. *Candida* maya hücreleri içindeki *H. pylori*’nin spontan gelişimi, her hastadaki *Candida* ve *H. pylori* varlığına bağlı olabildiği ve böyle bir gelişimin standart tedaviye karşı direnci tetikleyeceği düşünülmektedir. İleri yaş ve proton pompası inhibitörlerinin kullanımının yanında midenin maya kolonizasyonunu arttıran diğer faktörlerin belirlenmesi ve *H. pylori*’nin kesin olarak hangi durumlarda arttığının belirlenmesi önemlidir. Çalışmamız *H. pylori* eradikasyonunda başarıya ulaşabilmek için tedavi rejimlerine belki de *H. pylori* tedavisinin yanında (üçlü tedavi) *Candida* yoğunluğunun azaltılması (antifungal tedaviler) amacıyla antifungal ajanlarda eklenebileceğine dair fikir oluşmaktadır. Endofungal maya-bakteri birlikteliği sayesinde *Candida*’nın antifungallere karşı direnci zamanla artmaktadır. Belkide bu sayede yeni daha güçlü antifungal ajanların keşfedilmesini sağlanacaktır. *Candida* bolluğu ile *H. pylori*’nin tedavi direnci arasındaki ilişki hala bilinmemektedir. *H. pylori*’nin maya hücrelerinde büyümesini destekleyen çevresel koşulların ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir. Mayanın mide ortamındaki hangi koşullar altında *H. pylori*’yi dışarıya saldığı hala netliğe kavuşmamıştır ve bu alanda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Endofungal birlikteliği anlamak için yapay olarak laboratuvar ortamında maya-endobakteri sistemleri oluşturmayla ilgili çalışmalar artmaktadır.

KAYNAKLAR

Abaci, O. (2011). Investigation of extracellular phospholipase and proteinase activities of *Candida* species isolated from individuals denture wearers and genotypic distribution of *Candida albicans* strains. *Current Microbiology*, 62(4), 1308-1314.

Abadi, A.T.B.A., Perez-Perez, G. (2016). Role of dupA in virulence of *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*, 22(46):10118-10123

Abdel-Moein, K.A., Saeed, H., Samir, A. (2015). Novel detection of *Helicobacter pylori* in fish: A possible public health concern. *Acta Tropica*, 141-144

Ailloud, F., Estibariz, I., Suerbaum, S. (2021). Evolved to vary: Genome and epigenome variation in the human pathogen *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiology Reviews*, 45, fuaa042

Akada, J.K., Shirai, M., Takeuchi, H., Tsuda, M., Nakazawa, T. (2000). Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. *Molecular Microbiology*, 36(5):1071-84.

Albert M.J., Mathan V.I., Baker S.J. (1980). Vitamin B12 synthesis by human small intestinal bacteria. *Nature*. 283:781–782.

Alipour, N., Gaeini, N. (2017). *Helicobacter* is preserved in yeast vacuoles! Does Koch's postulates confirm it? *World J Gastroenterol*, 23(12):2266.

KAYNAKLAR (devam)

Allison D.L., Willems H.M., Jayatilake J.A., Bruno V.M., Peters B.M., Shirliff M.E. (2016). Candida-bacteria interactions: Their impact on human disease. *Microbiol. Spectr.* 4

Allonsius, C. N., Vandenheuvel, D., Oerlemans, E. F. M., Petrova, M. I., Donders, G. G. G., Cos, P., Delputte, P., & Lebeer, S. (2019). Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Scientific Reports*, 9, 2900.

Álvarez-Pérez, S., Lievens, B. & Fukami, T. (2019). Yeast–bacterium interactions: the next frontier in nectar research. *Trends in Plant Science*, 24, 393–401 (2019).

Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews.* 59, 143–169.

Anderson, M.R. (2004). Evaluation of vaginal complaints. *J. Am. Med. Assoc.* 291, 1368–1379.

Andes, D., Nett, J., Oschel, P., Albrecht, R., Marchillo, K., & Pitula, A. (2004). Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infection and Immunity*, 72, 6023–6031.

Armstrong, J. (2010). Yeast vacuoles: more than a model lysosome. *Trends in Cell Biology*, 20, 580–585.

KAYNAKLAR (devam)

Atherton, J. C., & Blaser, M. J. (2009). "Coadaptation of *Helicobacter pylori* and Humans: Ancient History, Modern Implications". *Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2475-2487.

Backert, S., & Blaser, M. J. (2016). The role of CagA in the gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Cancer Research*, 76(14), 4028-4031.

Ballou, E. R., Avelar, G. M., Childers, D. S., Mackie, J., Bain, J. M., Wagener, J., Kastora, S. L., Panea, M. D., Hardison, S. E., Walker, L. A., Erwig, L. P., Munro, C. A., Gow, N. A., Brown, G. D., MacCallum, D. M., & Brown, A. J. (2017). Lactate signalling regulates fungal β -glucan masking and immune evasion. *Nature Microbiology*, 2, 16238.

Bamford, C.V.; d'Mello, A.; Nobbs, A.H.; Dutton, L.C.; Vickerman, M.M.; Jenkinson, H.F. (2009). *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. *Infection and Immunity*, 77, 3696–3704.

Belkaid, Y., & Hand, T. W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, 157, 121–141. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>

Bertaux, J., Schmind, M., Hutzler, P., Hartmann, A., Garbaye, J., Frey-Klett, P. (2005). Occurrence and distribution of endobacteria in the plant-associated mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *Environmental Microbiology*, 7(11):1786-95.

KAYNAKLAR (devam)

Bianciotto V, Bandi C, Minerdi D, Sironi M, Tichy HV, Bonfante P.(1996).An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 62(8):3005–10.

Bittinger, K.; Charlson, E.S.; Loy, E.; Shirley, D.J.; Haas, A.R.; Laughlin, A.; Yi, Y.; Wu, G.D.; Lewis, J.D.; Frank, I. vd. (2014). Improved characterization of medically relevant fungi in the human respiratory tract using next-generation sequencing. *Genome Biol*,15, 487.

Bogaert, D.; Keijser, B.; Huse, S.; Rossen, J.; Veenhoven, R.; van Gils, E. (2011). Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: A metagenomic analysis. *PLoS ONE* 6, e17035

Bonfante, P. & Desirò, A. (2017). Who lives in a fungus? The diversity, origins and functions of fungal endobacteria living in Mucoromycota. *The ISME Journal*, 11, 1727–1735 (2017).

Bonfante, P., Desirò, A. (2017). Who lives in a fungus? The diversity, origins and functions of fungal endobacteria living in Mucoromycota. *The ISME Journal*, 11, 1727.

Botterel F., Angebault C., Cabaret O., Stressmann F.A., Costa J.M., Wallet F., Wallaert B., Bruce K., Delhaes L.(2018). Fungal and bacterial diversity of airway microbiota in adults with cystic fibrosis: Concordance between conventional methods and ultra-deep sequencing, and their practical use in the clinical laboratory. *Mycopathologia*. 183:171–183.

KAYNAKLAR (devam)

Bradford, L. L., & Ravel, J. (2017). The vaginal mycobiome: A contemporary perspective on fungi in women's health and diseases. *Virulence*, 8, 342– 351. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1237332>

Braga, R.M., Dourado, M.N., Araujo, W.L. (2016) Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47 Suppl 1: 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.005> PMID: 27825606

Brand A., Barnes J.D., Mackenzie K.S., Odds F.C., Gow N.A. (2008). Cell wall glycans and soluble factors determine the interactions between the hyphae of *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 287:48–55.

Brogden K.A., Guthmiller J.M., Taylor C.E. (2005). Human polymicrobial infections. *Lancet.* 365:253–255.

Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: Human fungal infections. *Science Translational Medicine*, 4, 165rv13.

Bruce A.W., Chadwick P., Hassan A., VanCott G.F. (1973). Recurrent urethritis in women. *Can. Med. Assoc. J.* 1973;108:973–976.

Cabral, D. J., Penumutthu, S., Norris, C., Morones-Ramirez, J. R., & Belenky, P. (2018). Microbial competition between *Escherichia coli* and *Candida albicans* reveals a soluble fungicidal factor. *Microb. Cell*, 5, 249–255.

KAYNAKLAR (devam)

Calsamiglia, M., Pijoan, C., Trigo, A. (1999). Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(3):246-51. doi: 10.1177/104063879901100307.

Caruso, R., Lo, B. C., & Núñez, G. (2020). Host–microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*, 20,411–426.

Castro-Seriche S, Jerez-Morales A, Smith CT, Sánchez-Alonzo K, García- Cancino A. (2021). *Candida albicans*, a reservoir of *Listeria monocytogenes*?, *Infect Genet Evol* 90:104779.

Ceccarani, C., Foschi, C., Parolin, C., D’Antuono, A., Gaspari, V., Consolandi, C., Laghi, L., Camboni, T., Vitali, B., Severgnini, M. vd. (2019). Diversity of vaginal microbiome and metabolome during genital infections. *Scientific Reports*, 9, 14095.

Chen, X., Zhou, X., Liao, B., Zhou, Y., Cheng, L., Ren, B. (2021) The cross-kingdom interaction between *Helicobacter pylori* and *Candida albicans*. *PLOS Pathogens* 17(5): e1009515.

Cheng, S., Jiang, J.W., Tan, L.T., Deng, J.X., Liang,P.Y., Su, H., Sun, Z.X., Zhou, Y. (2022). Plant Growth-Promoting Ability of Mycorrhizal *Fusarium* Strain KB-3 Enhanced by Its IAA Producing Endohyphal Bacterium, *Klebsiella aerogenes*. *Frontiers Microbiology*, 13:855399.

KAYNAKLAR (devam)

Chien, Y.-W.; Vidal, J.E.; Grijalva, C.G.; Bozio, C.; Edwards, K.M.; Williams, J.V.; Griffin, M.R.; Verastegui, H.; Hartinger, S.M.; Gil, A.I. vd. (2013). Density interactions among *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* in the nasopharynx of young peruvian children. *Pediatr. The Journal of Infectious Diseases*, 32, 72–77

Choi, D.S., Kim, D.K., Kim, Y.K., Gho, Y.S. (2015). Proteomics of extracellular vesicles: exosomes and ectosomes. *Mass Spectrometry Reviews*, 34(4):474-490.

Christensen, H., Hansen, M., Sørensen, J. (1999). Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence in situ hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1753–1761.

Cicero, A.L., Stahl, P.D., Raposo, G. (2015). Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Current Opinion in Cell Biology*, 35:69-77.

Colombo, M., Raposo, G., Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30:255-289.

Correa P. (2013) Gastric cancer: overview. *Gastroenterology Clinics of North America* .42(2):211–7.

Corsaro, D., Venditti, D., Padula, M., Valassina, M. (1999). Intracellular life. *Critical Reviews in Microbiology*, 25, 39–79.

KAYNAKLAR (devam)

Cover, T.L., Blanke, S.R. (2005). *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 320.

Coyte, K. Z., Schluter, J., & Foster, K. R. (2015). The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science*, 350, 663–666.

Cremers, A.J.H.; Zomer, A.L.; Gritzfeld, J.F.; Ferwerda, G.; van Hijum, S.A.F.T.; Ferreira, D.M.; Shak, J.R.; Klugman, K.P.; Boekhorst, J.; Timmerman, H.M. vd. (2014). The adult nasopharyngeal microbiome as a determinant of pneumococcal acquisition. *Microbiome*, 2, 44.

Cruz, M. R., Graham, C. E., Gagliano, B. C., Lorenz, M. C., & Garsin, D. A. (2013). *Enterococcus faecalis* inhibits hyphal morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 81, 189–200.

Cugini C., Calfee M.W., Farrow J.M., Morales D.K., Pesci E.C., Hogan D.A. (2007). Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 65:896–906.

Deatherage, B.L., Cookson, B.T. (2012). Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infection and Immunity*, 80(6):1948-1957.

Debowski, A.W., Walton, S.M., Chua, E., Tay, A.C., Liao, T., Lamichhane, B., Himbeck, R., Stubbs, K.A., Marshall, B.J., Fulurija, A., Benghezal, M. (2017). *Helicobacter pylori* gene silencing in vivo demonstrates urease is essential for chronic infection. *PLOS Pathogens*, 13(6): e1006464

KAYNAKLAR (devam)

d'Enfert, C., Kaune, A. K., Alaban, L. R., Chakraborty, S., Cole, N., Delavy, M., Kosmala, D., Marsaux, B., Fróis-Martins, R., Morelli, M., Rosati, D., Valentine, M., Xie, Z., Emritdoll, Y., Warn, P. A., Bequet, F., Bougnoux, M. E., Bornes, S., Gresnigt, M. S., Brown, A. J. P. (2021). The impact of the fungus-host- microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: Current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiology Reviews*, 45, fuaa060.

Denoncourt, A.M., Paquet, V.E., Charette, S.J. (2014). Potential role of bacteria packaging by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 5:240.

Deo, P.N.; Deshmukh, R. (2019). Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 23, 122–128.

Deveau, A., Bonito, G., Uehling, J., Paoletti, M., Becker, M., Bindschedler, S., Hacquard, S., Hervé, V., et al. (2018). Bacterial–fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 42, Issue 3, Pages 335–352.

Deveau, A., Bonito, G., Uehling, J., Paoletti, M., Becker, M., Bindschedler, Hacquard, S., Herve, V et al. (2018) Bacterial–fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiology Reviews*, 42, 335–352.

Dhamgaye, S., Qu, Y., & Peleg, A. Y. (2016). Polymicrobial infections involving clinically relevant Gram-negative bacteria and fungi. *Cellular Microbiology*, 18, 1716–1722.

KAYNAKLAR (devam)

Diaz P.I., Xie Z., Sobue T., Thompson A., Biyikoglu B., Ricker A., Ikonomou L., Dongari-Bagtzoglou A. (2012). Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel in vitro mucosal model. *Infect. Immun.* 80:620–632.

Dolatabadi, S.; Scherlach, K.; Figge, M.; Hertweck, C.; Dijksterhuis, J.; Menken, S.B.J; De Hoog, G.S. (2016). Food preparation with mucoralean fungi: A potential biosafety issue?. *Fungal Biology*, 120 (3), 393-401.

Donaldson G.P., Lee S.M., Mazmanian S.K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 14:20.

Drell T., Lillsaar T., Tummeleht L., Simm J., Aaspõllu A., Väin E., Saarma I., Salumets A., Donders G.G., Metsis M. (2013). Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age Estonian women. *PLoS ONE*.;8:e54379.

Dridi, B.; Raoult, D.; Drancourt, M. (2011). Archaea as emerging organisms in complex human. *Microbiomes*, 17, 56–63.

Dubois, A., Borén, T. (2007). *Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cellular Microbiology*, 9(5):1108–16.

Dupuy, A.K.; David, M.S.; Li, L.; Heider, T.N.; Peterson, J.D.; Montano, E.A.; Dongari-Bagtzoglou, A.; Diaz, P.I.; Strausbaugh, L.D. (2014). Redefining the human oral mycobiome with improved practices in amplicon-

KAYNAKLAR (devam)

based taxonomy: Discovery of *Malassezia* as a prominent commensal. *PLoS ONE* 9, e90899

Dyall, S.D., Johnson, P.J. (2000). Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution

Enaud R., Vandeborghht L.-E., Coron N., Bazin T., Prevel R., Schaeveerbeke T., Berger P., Fayon M., Lamireau T., Delhaes L. (2018). The mycobiome: A neglected component in the microbiota-gut-brain axis. *Microorganisms*. 6:22.

Falsetta M.L., Klein M.I., Colonne P.M., Scott-Anne K., Gregoire S., Pai C.-H., Gonzalez-Begne M., Watson G., Krysan D.J., Bowen W.H., et al. (2014). Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilm in vivo. *Infect. Immun.* 82:1968–1981.

Falsetta, M.L.; Klein, M.I.; Colonne, P.M.; Scott-Anne, K.; Gregoire, S.; Pai, C.-H.; Gonzalez-Begne, M.; Watson, G.; Krysan, D.J.; Bowen, W.H. (2014). Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilm in vivo. *Infection and Immunity*. 82, 1968–1981.

Fauzia, K.A., Miftahussurur, M., Syam, A.F., Waskito, L.A., Doohan, D., Rezkitha, Y.A.A., Matsumoto, T., Tuan, V.P., Akada, J., Yonezawa, H. vd. (2020). Biofilm formation and antibiotic resistance phenotype of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Toxins*, 12, 473.

KAYNAKLAR (devam)

Feng, Q., Chen, W.D., Wang, Y.D. (2018). Gut Microbiota: An Integral Moderator in Health and Disease, *Frontiers in Microbiology*, Volume 9.

Ferretti, P., Pasoli, E., Tett, A., Asnicar, F., Gorfer, V., Fedi, S., Armanini, F., Truong, D. T., Manara, S., Zolfo, M., Beghini, F., Bertorelli, R., De Sanctis, V., Bariletti, I., Canto, R., Clementi, R., Cologna, M., Crifò, T., Cusumano, G., Segata, N. (2018). Mother-to-infant microbial transmission from different body sites shapes the developing infant gut microbiome. *Cell Host & Microbe*, 24, 133– 145. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.005>

Figueiredo, C., Machado, J.C., Yamaoka, Y. (2005). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 10 (Suppl1): S14-20.

Flamaing, J.; Peetermans, W.E.; Vandeven, J.; Verhaegen, J. (2010). Pneumococcal colonization in older persons in a nonoutbreak setting. *J. Am. Geriatr. Soc*, 58, 396– 398.

Flieger, A., Frischknecht, F., Häcker, G., Hornef, M.W., Pradel, G. (2018). Pathways of host cell exit by intracellular pathogens. *Microbial Cell*, 5(12):525.

Foxman, B., Barlow, R., D’Arcy, H., Gillespie, B., & Sobel, J. D. (2000). *Candida vaginitis*: Self-reported incidence and associated costs. *Sexually Transmitted Diseases*, 27, 230– 235.

Förster T.M., Mogavero S., Dräger A., Graf K., Polke M., Jacobsen I.D., Hube B. (2016). Enemies and brothers in arms: *Candida albicans* and gram-positive bacteria. *Cell. Microbiol.* 18:1709–1715.

KAYNAKLAR (devam)

Förster, T. M., Mogavero, S., Dräger, A., Graf, K., Polke, M., Jacobsen, I. D., & Hube, B. (2016). Enemies and brothers in arms: *Candida albicans* and gram-positive bacteria. *Cellular Microbiology*, 18, 1709–1715

Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., Sarniguet, A. (2011). Bacterial–fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75, 583–609.

Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., Sarniguet, A. (2011). Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75: 583–609.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-11> PMID: 22126995

Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., Sarniguet, A. (2011). Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 583–609

Fuochi, V.; Li Volti, G.; Furneri, P.M. (2017). *Lactobacilli* dominance and vaginal pH: Why is the human vaginal microbiome unique? *Front. Microbiol.* 8, 19–36.

Garruti, G., Krasowska, D., & Maciejewski, R. (2021). *Helicobacter pylori* Virulence Factors—Mechanisms of Bacterial Pathogenicity in the Gastric Microenvironment" *Cells*, 10(1), 27.

KAYNAKLAR (devam)

Ghannoum M.A., Jurevic R.J., Mukherjee P.K., Cui F., Sikaroodi M., Naqvi A., Gillevet P.M. (2010). Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog.*;6.

Ghannoum, M.A.; Jurevic, R.J.; Mukherjee, P.K.; Cui, F.; Sikaroodi, M.; Naqvi, A.; Gillevet, P.M. (2010). Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLOS Pathogens*. 6, e1000713.

Gibson, J., Sood, A., & Hogan, D. A. (2009). *Pseudomonas aeruginosa-Candida albicans* interactions: Localization and fungal toxicity of a phenazine derivative. *Applied and Environment Microbiology*, 75, 504–513.

Gil, R., Latorre, A., Moya, A. (2004) Bacterial endosymbionts of insects: insights from comparative genomics. *Environmental Microbiology*, 6: 1109–1122. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00691.x> PMID: 15479245

Graham, C. E., Cruz, M. R., Garsin, D. A., & Lorenz, M. C. (2017). *Enterococcus faecalis* bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, 4507–4512.

Graham, D.Y., Dore, M.P., Lu, H. (2018). Understanding treatment guidelines with bismuth and non-bismuth quadruple *Helicobacter pylori* eradication therapies. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 16, 679–687.

Gross E.L., Beall C.J., Kutsch S.R., Firestone N.D., Leys E.J., Griffen A.L. (2012). Beyond *Streptococcus mutans*: Dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS ONE*. 7:e47722.

KAYNAKLAR (devam)

Gu H. (2017) Role of Flagella in the pathogenesis of *Helicobacter pylori*.
Current Microbiology, 74(7):863–9

Guinan, J., Wang, S., Hazbun, T. R., Yadav, H., & Thangamani, S. (2019). Antibiotic-induced decreases in the levels of microbial-derived short-chain fatty acids correlate with increased gastrointestinal colonization of *Candida albicans*. *Scientific Reports*, 9, 8872.

Guo, R.; Zheng, N.; Lu, H.; Yin, H.; Yao, J.; Chen, Y. (2012). Increased diversity of fungal flora in the vagina of patients with recurrent vaginal candidiasis and allergic rhinitis. *Microb. Ecol*, 64, 918–927

Guo, Y., Wei, C., Liu, C., Li, D., Sun, J., Huang, H., Zhou, H. (2015). Inhibitory effects of oral *Actinomyces* on the proliferation, virulence and biofilm formation of *Candida albicans*. *Archives of Oral Biology*. 60, 1368–1374.

Guyton, A. C. & Hall, J. E. (2006). Textbook of Medical Physiology. Elsevier Saunders. 14th Edition Hardback. ISBN: 9780323597128, Paperback ISBN: 9780323672801

Hameed, A., Hans, S., Monasky, R., Thangamani, S., Fatima, Z. (2021). Understanding Human Microbiota Offers Novel and Promising Therapeutic Options against *Candida* Infections, *Pathogens*, 10,183

Haque, M., Hirai, Y., Yokota, K., Mori, N., Jahan, I., Ito, H., Hotta, H., Yano, I., Kanemasa, Y., Oguma, K. (1996). Lipid profile of *Helicobacter* spp.: presence of cholesteryl glucoside as a characteristic feature. *Journal of Bacteriology*, 178: 2065- 2070

KAYNAKLAR (devam)

Har SK, Soni RK, Das BK, Mukhopadhyay G. (2003).Molecular mechanism of action of major *Helicobacter pylori* virulence factors. *Mol Cell Biochem*, 253:207-15

Hazen, K.C. (2005). New and Emerging Yeast Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 8, 462–478.

Helmink, B. A., Khan, M. A. W., Hermann, A., Gopalakrishnan, V., & Wargo, J. A. (2019). The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nature Medicine*, 25, 377–388.

Heydari, S., Malekzadeh, R., Jazayeri, M.H., Sarrafnejad, A., Siavoshi, F. (2022) Detection of peptidoglycan in yeast as a marker for the presence or abundance of intracellular *Helicobacter pylori* and *Staphylococcus*. *Archives of Microbiology*, 204(7):407. [https://doi: 10.1007/s00203-022-03045-y](https://doi.org/10.1007/s00203-022-03045-y)

Heydari, S., Siavoshi, F., Jazayeri, M.H., Sarrafnejad, A., Saniee, P. (2020) *Helicobacter pylori* release from yeast as a vesicle-encased or free bacterium. *Helicobacter*, 25(5):e12725.

Heydari, S., Siavoshi, S., Ebrahimi, H., Sarrafnejad, A., Sharifi, A.H. (2020b). Excision of endosymbiotic bacteria from yeast under aging and starvation stresses. *Infection, Genetics and Evolution*, 78:104141.

Hiengrach, P., Panpetch, W., Chindamporn, A., Leelahavanichkul A. (2022). *Helicobacter pylori*, Protected from Antibiotics and Stresses Inside *Candida albicans* Vacuoles, Cause Gastritis in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 8568. <https://doi.org/10.3390/ijms23158568>

KAYNAKLAR (devam)

Hildebrandt, E., McGee, D.J. (2009). *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide modification, Lewis antigen expression, and gastric colonization are cholesterol-dependent. *BMC Microbiolgy*, 9: 258.

Hill, C., Ross, R. P., Stanton, C., O'Toole, P. W. (2016). The Human Microbiome in Health and Disease. *Host - Pathogen Interaction*, 57–76.

Hoerauf, A., Volkmann, L., Hamelmann, C., Adjei, O., Autenrieth, I.B., Fleischer, B., vd. (2000). Endosymbiotic bacteria in worms as targets for a novel chemotherapy in filariasis. *The Lancet*, 355: 1242–1243. PMID: 10770311

Hogan D.A., Kolter R. (2002). *Pseudomonas-Candida* interactions: An ecological role for virulence factors. *Science*. 296:2229–2232.

Hogan, D. A., Vik, Å., & Kolter, R. (2004). A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular Microbiology*, 54, 1212–1223.

Hou, K., Wu, ZX., Chen, XY. et al. (2022). Microbiota in health and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 7, 135.

Hu, Y., Zhu, Y., Lu, N.H. (2020). Recent progress in *Helicobacter pylori* treatment. *Chinese Medical Journal*, 133, 335–343.

Hwang G., Liu Y., Kim D., Li Y., Krysan D.J., Koo H.(2017). *Candida albicans* mannans mediate *Streptococcus mutans* exoenzyme GtfB binding to modulate cross-kingdom biofilm development in vivo. *PLoS Pathog.* 13:e1006407.

KAYNAKLAR (devam)

Hybiske, K., Stephens, R. (2015). Cellular Exit Strategies of Intracellular Bacteria. *Microbiology spectrum*,. 3(6).

Ibrahim, A.S.; Gebremariam, T.; Liu, M.; Chamilos, G.; Kontoyiannis, D.P.; Mink, R.; Kwon-Chung, K.J.; Fu, Y.; Skory, C.D.; Edwards Jr; J.E. and Spellberg, B. (2008). Bacterial Endosymbiosis Is Widely Present among Zygomycetes but Does Not Contribute to the Pathogenesis of Mucormycosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 7, 1083-1090.

Ireton, K., Van Ngo, H., Bhalla, M. (2018). Interaction of microbial pathogens with host exocytic pathways. *Cellular Microbiology*, 20(8):e12861.

Jeffery, I. B., O'Herlihy, E. O., Shanahan, F., & O'Toole, P. W. (2020). Microbiome alterations in IBS. *Gut*, 69, 2263–2264.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-320919>

Jennessen, J., Nielsen, K.F., Houbraken, J., Lyhne, E.K., Schnürer, J., Frisvad, J.C. and Samson, R.A. (2005). Secondary Metabolite and Mycotoxin Production by the *Rhizopus microsporus* Group. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:1833- 1840.

Johansson, M., Lehto, M., Tanhuanpää, K., Cover, T.L., Olkkonen, V.M. (2005). The oxysterol- binding protein homologue ORP1L interacts with Rab7 and alters functional properties of late endocytic compartments. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 5480– 5492.

Joyner, P. M., Liu, J., Zhang, Z., Merritt, J., Qi, F., & Cichewicz, R. H. (2010). Mutanobactin A from the human oral pathogen *Streptococcus*

KAYNAKLAR (devam)

mutans is a cross-kingdom regulator of the yeast-mycelium transition. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 8, 5486–5489.

Kalia, N., Singh, J., & Kaur, M. (2020). Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: A critical review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19, 5. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-0347-4>

Kapitan, M., Niemiec, M. J., Steimle, A., Frick, J. S., & Jacobsen, I. D. (2019). Fungi as part of the microbiota and interactions with intestinal bacteria. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 422, 265–301.

Karkowska-Kuleta, J.; Bartnicka, D.; Zawrotniak, M.; Zielinska, G.; Kieronska, A.; Bochenska, O.; Ciaston, I.; Koziel, J.; Potempa, J.; Baster, Z. (2018). The activity of bacterial peptidylarginine deiminase is important during formation of dual-species biofilm by periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* and opportunistic fungus *Candida albicans*. *Pathogens and Disease*, 76, fty033.

Keeling, P.J., Palmer, J.D. (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics*, 9, 605.

Kharchuk MS, Glushenkov AN, Gromozova EN. (2019). Analysis of the motion of vacuolar volutin granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol (Praha)*. 64(2):207–13

Kim, S. H., Clark, S. T., Surendra, A., Copeland, J. K., Wang, P. W., Ammar, R., Collins, C., Tullis, D.E., Nislow, C., Hwang, D. M., Guttman, D.

KAYNAKLAR (devam)

S., & Cowen, L. E. (2015). Global analysis of the fungal microbiome in cystic fibrosis patients reveals loss of function of the transcriptional repressor Nrg1 as a mechanism of pathogen adaptation. *PLoS Path*, 11, e1005308.

Kim, Y., & Mylonakis, E. (2011). Killing of *Candida albicans* filaments by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is mediated by sopB effectors, parts of a type III secretion system. *Eukaryotic Cell*, 10, 782–790.

Klimesova, K.; Jiraskova Zakostelska, Z.; Tlaskalova-Hogenova, H. (2018). Oral bacterial and fungal microbiome impacts colorectal carcinogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 9, 774

Kobayashi, Y. (2000). Bacteremic *Moraxella catarrhalis* pneumonia. *J. Infect. Chemother*, 6, 68

Kotilea, K., Bontems, P., Touati, E. (2019). Epidemiology, diagnosis and risk factors of *Helicobacter pylori* infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1149, 17–33

Krüger W, Vielreicher S, Kapitan M, Jacobsen ID, Niemiec MJ. (2019). Fungal-Bacterial Interactions in Health and Disease. *Pathogens*.8(2):70.

Krzysciak, W.; Koscielniak, D.; Papiez, M.; Vyhouskaya, P.; Zagorska-Swiezy, K.; Kolodziej, I.; Bystrowska, B.; Jurczak, A. (2017). Effect of a lactobacillus salivarius probiotic on a double-species *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* caries biofilm. *Nutrients*, 9, 1242.

KAYNAKLAR (devam)

Kumamoto, C. A., Gresnigt, M. S., & Hube, B. (2020). The gut, the bad and the harmless: *Candida albicans* as a commensal and opportunistic pathogen in the intestine. *Current Opinion in Microbiology*, 56, 7–15.

Kumar, Y., Valdivia, R.H. (2009). Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. *Cell Host & Microbe*, 5, 593–601.

Kusters, J.G., Vliet, A.H.M., Kuipers, E.J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*, 19:449-90

Kwak, M.-K., Liu, R., Kim, M. K., Moon, D., Kim, A. H., Song, S. H., & Kang, S. O. (2014). Cyclic dipeptides from lactic acid bacteria inhibit the proliferation of pathogenic fungi. *Journal of Microbiology*, 52, 64–70.

Lackner, G. and Hertweck, C. (2011). Impact of Endofungal Bacteria on Infection Biology, Food safety, and Drug development. *PloS Pathogens*, 7(6),1-4

Lackner, G., Mobius, N., Scherlach, K., Partida-Martinez, L.P., Winkler, R., Schmitt, I. vd. (2009a). Global Distribution and Evolution of a Toxinogenic *Burkholderia-Rhizopus* Symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2982–2986. <https://doi.org/10.1128/AEM.01765-08> PMID: 19286793

Lackner, G., Moebius, N., Partida-Martinez, L.P., Boland, S. and Hertweck, C. (2011). Evolution of an endofungal lifestyle: Deductions from the *Burkholderia rhizoxinica* genome. *BMC Genomics*, 12:1-13.

KAYNAKLAR (devam)

Lackner, G., Partida-Martinez, L. P. and Hertweck, C. (2009b). Endofungal bacteria as producers of mycotoxins. *Trends Microbiology*, 17 (12), 570-576.

Lamoth, F., Lockhart, S.R., Berkow, E.L., Calandra, T. (2018). Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73, i4–i13.

Leclair L.W., Hogan D.A. (2010). Mixed bacterial-fungal infections in the CF respiratory tract. *Med. Mycol.* 48:125–132

Lee D.G., Park, Y., Kim, H.N., Kim, H.K., Kim, P.I., Choi, B.H. vd. (2002b). Antifungal mechanism of an antimicrobial peptide, HP (2–20), derived from N-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1 against *Candida albicans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(4):1006–13.

Lee, D.G., Kim, P.I., Park, Y., Jang, S.H., Park, S.C., Woo, E.R. vd. (2002a) HP (2–20) derived from the amino terminal region of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1 exerts its antifungal effects by damaging the plasma membranes of *Candida albicans*. *Journal of Peptide Science*, 8(8):453–60.

Lee, D.G., Park, Y., Kim, P.I., Jeong, H.G., Woo, E.R., Hahm, K.S. (2002c) Influence on the plasma membrane of *Candida albicans* by HP (2–9)-magainin 2 (1–12) hybrid peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297(4):885–9.

KAYNAKLAR (devam)

Lertsethtakarn, P., Ottemann, K. M., & Hendrixson, D. R. (2011). Motility and Chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annual Review of Microbiology*, 65, 389-410.

Liang, W., Guan, G., Dai, Y., Cao, C., Tao, L., Du, H., Nobile, C. J., Zhong, J., & Huang, G. (2016). Lactic acid bacteria differentially regulate filamentation in two heritable cell types of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 102, 506–519.

Limon, J. J., Skalski, J. H., & Underhill, D. M. (2017). Commensal fungi in health and disease. *Cell Host & Microbe*, 22, 156–165.

Lindsay, A. K., Morales, D. K., Liu, Z., Grahl, N., Zhang, A., Willger, S. D., Myers, L. C., & Hogan, D. A. (2014). Analysis of *Candida albicans* mutants defective in the Cdk8 module of mediator reveal links between metabolism and biofilm formation. *PLoS Genetics*, 10, e1004567.

Liu, C.M.; Price, L.B.; Hungate, B.A.; Abraham, A.G.; Larsen, L.A.; Christensen, K.; Stegger M.; Skov, R.; Andersen, P.S. (2015). *Staphylococcus aureus* and the ecology of the nasal microbiome. *Science Advances*, 1, e1400216.

Liu, D., Coloe, S., Baird, R., & Pedersen, J. (2000). Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 471.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88759/>

KAYNAKLAR (devam)

Liu, H. Y., Li, C. X., Liang, Z. Y., Zhang, S. Y., Yang, W. Y., Ye, Y. M., Lin, Y. X., Chen, R. C., Zhou, H. W., & Su, J. (2020). The interactions of airway bacterial and fungal communities in clinically stable asthma. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1647.

Liu, X.L., Zhao, H., Wang, Y.X., Liu, X.Y., Jiang, Y., Tao, M.F., Liu, X.Y. (2024). Detecting and characterizing new endofungal bacteria in new hosts: *Pandoraea sputorum* and *Mycetohabitans endofungorum* in *Rhizopus arrhizus*. *Frontiers Microbiology* :1346252.

Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D., & Nobile, C. J. (2017). Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 19–31.

Lourenco, A., Pedro, N. A., Salazar, S. B., & Mira, N. P. (2019). Effect of acetic acid and lactic acid at low pH in growth and azole resistance of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3265.

Lowe, C.D., Minter, E.J., Cameron, D.D., Brockhurst, M.A. (2016). Shining a light on exploitative host control in a photosynthetic endosymbiosis. *Current Biology*, 26, 207– 211.

M. Otto. (2009). “*Staphylococcus epidermidis*--The ‘Accidental’ Pathogen.” *Nature Reviews Microbiology* 7 no. 8 :555–567.

MacAlpine, J., Robbins, N., Cowen, L.E. (2022). Bacterial-fungal interactions and their impact on microbial pathogenesis. *Molecular Ecology*, 32:2565–2581.

KAYNAKLAR (devam)

Marrazzo, J.M. (2011). Interpreting the epidemiology and natural history of bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol.* 17, 186–190.

Massarrat, S., Saniee, P., Siavoshi, F., Mokhtari, R., Mansour-Ghanaei, F., Khalili Samani, S. (2016) The Effect of *Helicobacter pylori* infection, aging, and consumption of Proton Pump inhibitor on fungal colonization in the stomach of dyspeptic patients. *Frontiers in Microbiology*, 7:801.

Mauël J. (1983). Mécanismes de la microbicidie intracellulaire [Mechanisms of intracellular microbicide]. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 19(2):115-22.

McCarty, T.P., Pappas, P.G. (2016). Invasive Candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30, 103–124.

McGee, D.J., George, A.E., Trainor, E.A., Horton, K.E., Hildebrandt, E., Testerman, T.L. (2011). Cholesterol enhances *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics and LL-37. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55: 2897-2904.

Mille-Lindblom, C., Tranvik, L.J. (2003) . Antagonism between bacteria and fungi on decomposing aquatic plant litter. *Microbial Ecology*, 45, 173–182.

Moissl-Eichinger, C.; Pausan, M.; Taffner, J.; Berg, G.; Bang, C.; Schmitz, R.A. (2018). Archaea are interactive components of complex microbiomes. *Trends in Microbiology*, 26, 70–85.

Mondo, S. J., Lastovetskk, O.A, Gaspar, M.L., Schwardt, N.H., Barber, C.C., Riley, R., Sun, H., Grigoriev, I.V., Pawlowska, T.E. (2017). Bacterial

KAYNAKLAR (devam)

endosymbionts influence host sexuality and reveal reproductive genes of early divergent fungi. *Nature Communications*, 8, 1843.

Morak, M. J. M., van Lent, A. U. C., Swinnen, J., Polder, G. J., & Vriens, M. R. (2012). "High Throughput Quantitative Assessment of *H. pylori* in Gastric Biopsies by FISH Analysis". *World Journal of Gastroenterology*, 18(19), 2413-2417.

Morales, D. K., Grahl, N., Okegbe, C., Dietrich, L. E., Jacobs, N. J., & Hogan, D. A. (2013). Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *MBio*, 4,e00526-12.

Morse, D. J., Wilson, M. J., Wei, X., Bradshaw, D. J., Lewis, M. A. O., & Williams, D. W. (2019). Modulation of *Candida albicans* virulence in in vitro biofilms by oral bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 68, 337–343.

Mosse B. (1970). Honey-coloured, sessile Endogone spores: II. Changes in fine structure during spore development. *Archives of Microbiology*, 74: 129–145.

Moura-Alves, P., Faé, K., Houthuys, E., Dorhoi, A., Kreuchwig, A., Furkert, J., Barison, N., Diehl, A., Munder, A., Constant, P., Skrahina, T., Gühlich-Bornhof, U., Klemm, M., Koehler, A. B., Banderhmann, S., Goosmann, C., Mollenkopf, H. J., Hurwitz, R., Brinkmann, V.,

KAYNAKLAR (devam)

Kaufmann, S. H. (2014). AhR sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence. *Nature*, 512, 387–392.

Moyes, D. L., Wilson, D., Richardson, J. P., Mogavero, S., Tang, S. X., Wernecke, J., Höfs, S., Gratacap, R. L., Robbins, J., Runglall, M., Murciano, C., Blagojevic, M., Thavaraj, S., Förster, T. M., Hebecker, B., Kasper, L., Vizcay, G., Iancu, S. I., Kichik, N., Naglik, J. R. (2016). Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*, 532, 64–68.

Murphy, T.F.; Parameswaran, G.I. (2009). *Moraxella catarrhalis*, a human respiratory tract pathogen. *Clin. Infect. Dis.*, 2009, 49, 124–131.

Noble, S. M., Gianetti, B. A., & Witchley, J. N. (2017). *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 96–108.

Nogueira, F., Sharghi, S., Kuchler, K., & Lion, T. (2019). Pathogenetic impact of bacterial-fungal interactions. *Microorganisms*, 7, 459

Nowack, E. C. & Melkonian, M. (2010). Endosymbiotic associations within protists. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*, 365, 699–712 (2010).

O'Donnell, L. E., Millhouse, E., Sherry, L., Kean, R., Malcolm, J., Nile, C. J., & Ramage, G. (2015). Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity. *FEMS Yeast Research*, 15, fov077.

KAYNAKLAR (devam)

Ohshima S., Sato, Y., Fujimura, R., Takashima, Y., Hamada, M., Nishizawa, T., Narisawa, K., Ohta, H. (2016). *Mycoavidus cysteinexigens* gen. nov., sp. nov., an endohyphal bacterium isolated from a soil isolate of the fungus *Mortierella elongate*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(5): 2052-7.

Oleastro, M., Menard, A. (2013). The Role of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Proteins in Adherence and Pathogenesis, *Biology*, 2(3),1110-1134

Olivera-Severo, D., Uberti, A.F., Marques, M.A., Pinto, M.T., Gomez-Lazaro, M., Figueiredo, C., Leite, M., Carlini, C.R. (2017). New Role for *Helicobacter pylori* Urease: Contributions to Angiogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 27:8:1883.

Olivera-Severo, D., Uberti, A.F., Marques, M.S., Pinto, M.T., Gomez-Lazaro, M., Figueiredo, C., Leite, M., Carlini, C.R. (2017). A New Role for *Helicobacter pylori* Urease: Contributions to Angiogenesis. *Frontiers in Microbiology*, Volume 8

Opulente, D.A., Langdon, Q.K., Buh, K.V., Haase, M.A.B., Sylvester, K., Moriarty, R.V., Jarzyna, M., Considine, S.L., Schneider, R.M., Hittinger, C.T. (2019). Pathogenic budding yeasts isolated outside of clinical settings. *FEMS Yeast Research*, 19, foz032.

Palacio, A.; Villar, J.; Alhambra, A. (2009). Epidemiology of invasive candidiasis in pediatric and adult population. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26, 2–7.

KAYNAKLAR (devam)

Palmer, G.E. (2011). Vacuolar trafficking and *Candida albicans* pathogenesis. *Communicative & Integrative Biology*, 4(2): 240–242.

Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D., et al. (2009). "Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America". *Clinical Infectious Diseases*, 48(5), 503-535.

Pappas, P.G., Lionakis, M.S., Arendrup, M.C., Ostrosky-Zeichner, L., Kullberg, B.J. (2018). Invasive Candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18026.

Park, Y., Lee, D.G., Hahm, K.S. (2004). HP(2–9)-magainin 2(1–12), a synthetic hybrid peptide, exerts its antifungal effect on *Candida albicans* by damaging the plasma membrane. *Journal of Peptide Science*, 10(4):204–9.

Partida-Martinez L.P., Groth, I., Schmitt, I., Richter, W., Roth, M., Hertweck, C. (2007a). *Burkholderia rhizoxinica* sp. nov. and *Burkholderia endofungorum* sp. nov., bacterial endosymbionts of the plant-pathogenic fungus *Rhizopus microsporus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2583–2590. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64660-0> PMID: 17978222

Partida-Martinez, L. P.; Bandemer, S., R  chel, R.; Dannaoui, E. and Hertweck, C. (2008). Lack of evidence of endosymbiotic toxin-producing bacteria in clinical *Rhizopus* isolates. *Mycoses*, 51, 266-269.

KAYNAKLAR (devam)

Partida-Martinez, L.P. and Hertweck, C. (2007). “A Gene Cluster Encoding Rhizoxin Biosynthesis in “*Burkholderia rhizoxinica*” , the Bacterial Endosymbiont of the Fungus “*Rhizopus microsporus*“. *Chembiochem*, 8:41-45.

Partida-Martinez, L.P., Looß, C.F., Ishida, K., Ishida M., Roth, M., Buder, K. and Hertweck, C. (2007b). Rhizonin, the First Mycotoxin Isolated from the Zygomycota, Is Not a Fungal Metabolite but Is Produced by Bacterial Endosymbionts. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:793-797.

Partida-Martinez, L.P., Monajembashi, S., Greulich, K.O. and Hertweck, C. (2007c). Endosymbiont-Dependent Host Reproduction Maintains Bacterial- Fungal Mutualism, *Current Biology*, 17:773-777.

Paterson, M. J., Oh, S., & Underhill, D. M. (2017). Host-microbe interactions: commensal fungi in the gut. *Current Opinion in Microbiology*, 40, 131–137.

Pawlowska, T.E., Gaspar, M.L., Lastovetsky, O.A, Mondo, S.J., Real-Ramirez, I., Shakya, E., Bonfante, P. (2018). Biology of fungi and their bacterial endosymbionts. *Annual Review of Phytopathology*, 56, 289–309 (2018).

Peleg A.Y., Hogan D.A., Mylonakis E. (2010). Medically important bacterial–fungal interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:340.

Peleg, A. Y., Hogan, D. A., & Mylonakis, E. (2010). Medically important bacterial-fungal interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 8,340–349.

KAYNAKLAR (devam)

Pellicano, R., Zagari, R.M., Zhang, S., Saracco, G.M., Moss, S.F. (2018). Pharmacological considerations and step-by-step proposal for the treatment of *Helicobacter pylori* infection in the year 2018. *Minerva Gastroenterology*, 64, 310–321

Pendharkar, S., Brandsborg, E., Hammarström, L., Marcotte, H., & Larsson, P.-G. (2015). Vaginal colonisation by probiotic lactobacilli and clinical outcome in women conventionally treated for bacterial vaginosis and yeast infection. *BMC Infectious Diseases*, 15, 255.

Petersen, A.M., Krogfelt, K.A. (2003). *Helicobacter pylori*: an invading microorganism? A review. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 36(3):117–26.

Peterson, J.; Garges, S.; Giovanni, M.; McInnes, P.; Wang, L.; Schloss, J.A.; Bonazzi, V.; McEwen, J.E.; Wetterstrand, K.A.; Deal, C.; vd. (2010). The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 2010, 19, 2317–2323.

Posselt, G., Backert, S., Wessler, S. (2013). The functional interplay of *Helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Communication and Signaling*, 77

Puchkov EO. (2010). Brownian motion of polyphosphate complexes in yeast vacuoles: characterization by fluorescence microscopy with image analysis. *Yeast*. 27(6):309– 15. 10.1002/yea.1754

KAYNAKLAR (devam)

Rada, B., & Leto, T. L. (2013). Pyocyanin effects on respiratory epithelium: Relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends in Microbiology*, 21, 73–81.

Rall G., Knoll L.J. (2016). Development of complex models to study co- and polymicrobial infections and diseases. *PLoS Pathog.* 12:e1005858.

Raposo, G., Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4):373-383.

Richter, I., Hasan, M., Kramer, J.W., Wein, P., Krabbe, J., Wojtas, K.P., Stinear, T.P., Pidot, S.J., Kloss, F., Hertweck, C., Lackner, G. (2024). Deazaflavin metabolite produced by endosymbiotic bacteria controls fungal host reproduction. *ISME Journal*, 18(1):wrae074.

Rutherford, J.C. (2014). The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. *PLOS Pathogens*, 10(5): e1004062.

Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J., Dowling, D.N. (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 278: 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x> PMID: 18034833

Salama, N. R., Hartung, M. L., & Müller, A. (2013). Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature Reviews Microbiology*, 11(6), 385-399

KAYNAKLAR (devam)

Salvatori, O., Kumar, R., Metcalfe, S., Vickerman, M., Kay, J. G., & Edgerton, M. (2020). Bacteria modify *Candida albicans* hypha formation, microcolony properties, and survival within macrophages. *mSphere*, 5, e00689-20.

Sánchez-Alonzo, K., Belmar, L., Parra-Sepúlveda, C., Bernasconi, H., Campos, V.L., Smith, C.T. vd. (2021) Antibiotics as a stressing factor triggering the harboring of *Helicobacter pylori* J99 within *Candida albicans* ATCC10231. *Pathogens*, 10(3).

Sánchez-Alonzo, K., Parra-Sepúlveda, C., Vega, S., Bernasconi, H., Campos, V.L., Smith, C.T. et al. (2020) In Vitro Incorporation of *Helicobacter pylori* into *Candida albicans* caused by acidic pH stress. *Pathogens*, 9(6).

Sánchez-Alonzo, K., Parra-Sepúlveda, C., Vega, S., Bernasconi, H., Campos, V.L., Smith, C.T., vd. (2020) In vitro incorporation of *Helicobacter pylori* into *Candida albicans* caused by acidic pH stress. *Pathogens*, 9(6):489.

Saniee, P., Siavoshi, F., Broujeni, G.N., Khormali, M., Sarrafnejad, A., Malekzadeh, R. (2013). Immunodetection of *Helicobacter pylori*-specific proteins in oral and gastric *Candida* yeasts. *Arch Iran Med*, 16(11).

Santos, F.D.A.G.D., Leite-Andrade, M.C., Brandão, I.D.S., Alves, A.I.D.S., Buonafina, M.D.S., Nunes, M., de Araújo-Neto, L.N., de Freitas, M.A., Brayner, F.A., Alves, L.C. vd. (2020). Anti-biofilm effect by the combined action of fluconazole and acetylsalicylic acid against species of *Candida parapsilosis* complex. *Infection, Genetics and Evolution*, 84, 104378

KAYNAKLAR (devam)

Santus, W., Devlin, J. R., & Behnsen, J. (2021). Crossing kingdoms: How the mycobiota and fungal-bacterial interactions impact host health and disease. *Infection and Immunity*, 89, e00648–e720. <https://doi.org/10.1128/IAI.00648-20>

Scherlach, K., Graupner, K., Hertweck, C. (2013). Molecular bacteria-fungi interactions: effects on environment, food, and medicine. *Annual Review of Microbiology*, 67, 375– 397.

Schmitt, I., Partida-Martinez, L.P., Winkler, R., Voigt, K., Einax, E., Dölz, F., Telle, S., Wöstemeyer, J. and Hertweck, C. (2008). Evolution of host resistance in a toxin producing bacterial-fungal alliance. *ISME Journal*, 2:632-641.

Schulz-Bohm, K., Tyc, O., Boer, D. W., Peereboom, N., Debets, F., Zaagman, N., Janssens, T.K.S, Garbeva, P. (2017) Fungus-associated bacteriome in charge of their host behavior. *Fungal Genetics and Biology*, 102:38-48.

Schwabe, R. F., & Jobin, C. (2013). The microbiome and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13, 800–812.

Schwartz, J.T, Allen, L.A.H. (2006). Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, Volume 79, Issue 6, Pages 1214–1225.

Sedarat, Z., Taylor-Robinson, A. (2024). *Helicobacter pylori* Outer Membrane Proteins and Virulence Factors: Potential Targets for Novel Therapies and Vaccines. *Pathogens*, 13(5).

KAYNAKLAR (devam)

Sen, D., Paul, K., Saha, C., Mukherjee, G., Nag, M., Ghosh, S., Das, A., Seal, A., Tripathy, S. (2019). A unique life-strategy of an endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* JGTA-S1—a comparative genomics viewpoint. *DNA Research*, 26, 131–146.

Sender R., Fuchs S., Milo R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.*;14:e1002533.

Shah, A.C., Piazzuelo, M.B., Kuipers, E.J., Li, D. (2021). AGA Clinical Practice Update on the Diagnosis and Management of Atrophic Gastritis: Expert Review. *Gastroenterology*, 161(4):1325-1332.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2021.06.078.

Shak, J.R.; Vidal, J.E.; Klugman, K.P. (2013). Influence of bacterial interactions on pneumococcal colonization of the nasopharynx. *Trends in Microbiology*, 21, 129–135.

Shapiro, R. S., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2011). Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75, 213–267.

Shi, Z., Shi, X., Ullah, M. W., Li, S., Revin, V. R., Yang, G. (2018). Fabrication of nanocomposites and hybrid materials using microbial biotemplates. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 1, 79–93. doi: 10.1007/s42114-017- 0018-x

KAYNAKLAR (devam)

Shirtliff, M.E., Peters, B.M., Jabra-Rizk, M.A. (2009). Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 299, 1–8.

Shoham, S.; Levitz, S.M. (2005). The Immune Response to Fungal Infections. *British Journal of Haematology*, 129, 569–582.

Siavoshi F, Saniee P.(2014). Vacuoles of *Candida* yeast as a specialized niche for *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*, 20(18):5263.

Siavoshi, F., Heydari, S., Shafiee, M., Ahmadi, S., Saniee, P., Sarrafnejad, A., Kolahdoozan, S. (2019). Sequestration inside the yeast vacuole may enhance *Helicobacter pylori* survival against stressful condition. *Infection, Genetics and Evolution*, 69:127-133. doi: 10.1016/j.meegid.2019.01.029.

Siavoshi, F., Salmanian, A.H., Akbari, F., Malekzadeh, R., Massarrat, S. (2005). Detection of *Helicobacter pylori*-specific genes in the oral yeast. *Helicobacter*, 10(4):318–22.

Siavoshi, F., Salmanian, A.H., Kbari, F.A., Malekzadeh, R., Massarrat, S. (2005). Detection of *Helicobacter pylori*-specific genes in the oral yeast. *Helicobacter*, 10 (4):318–22.

Siavoshi, F., Saniee, P. (2014). Vacuoles of *Candida* yeast as a specialized niche for *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*, 20, 5263.

KAYNAKLAR (devam)

Siavoshi, F., Taghikhani, A., Malekzadeh, R., Sarrafnejad, A., Kashanian, M., Jamal, A.S. vd. (2013) The role of mother's oral and vaginal yeasts in transmission of *Helicobacter pylori* to neonates. *Archives of Iranian Medicine*, 16(5):288–94.

Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., et al. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, 10(12):1470.

Sobel, J. D. (2016). "Recurrent Vulvovaginal Candidiasis". *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 194(6), 129-134.

Soucy, S.M., Huang, J., Gogarten, J.P. (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, 16, 472.

Spraker, J.E., Sanchez, L.M., Lowe, T.M., Dorrestein, P.C., Keller, N.P. (2016). *Ralstonia solanacearum* lipopeptide induces chlamydospore development in fungi and facilitates bacterial entry into fungal tissues. *The ISME Journal*, 10, 2317.

Takashima, Y., Yamamoto, K., Degawa, Y., Guo, Y. Nishizawa, T., Ohta, H., Narisawa, K. (2023). Detection and isolation of a new member of *Burkholderiaceae*-related endofungal bacteria from *Saksenaea boninensis* sp. nov., a new thermotolerant fungus in *Mucorales*. *IMA Fungus*, 14:24.

Tan, T.T.; Mörgelin, M.; Forsgren, A.; Riesbeck, K. (2007). *Haemophilus influenzae* survival during complement-mediated attacks is promoted by

KAYNAKLAR (devam)

Moraxella catarrhalis outer membrane vesicles. *The Journal of Infectious Diseases*, 195, 1661–1670

Tansarli, G.S., Eschbacher, J., Schroeder, L.K., SenGupta, D., Lieberman, J.A. (2023). *Mycetohabitans rhizoxinica* in Patients with Rhinocerebral Mucormycosis Due to *Rhizopus microsporus*. *Mycopathologia*, 188(1-2):151-153.

Tapanila, L. (2005). Palaeoecology and diversity of endosymbionts in Palaeozoic marine invertebrates: Trace fossil evidence. *Lethaia*. 2005; 38: 89–99. <https://doi.org/10.1080/00241160510013123>

Tarkka, M.T., Sarniguet, A., Frey-Klett, P. (2009). Inter-kingdom encounters: recent advances in molecular bacterium–fungus interactions. *Current Genetics*, 55, 233–243.

Tavakolian, A., Heydari, S., Siavoshi, F., Brojeni, G.N., Sarrafnejad, A., Eftekhari, F., Khormali, M. (2019). Localization of *Staphylococcus* inside the vacuole of *Candida albicans* by immunodetection and FISH. *Infection, Genetics and Evolution*, 75:104014.

Thakur, B.K., Zhang, H., Becker, A., et al. (2014). Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Research*, 24(6):766.

Thein, Z. M., Samaranayake, Y. H., & Samaranayake, L. P. (2006). Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Archives of Oral Biology*, 51, 672–680.

KAYNAKLAR (devam)

Thevaranjan, N.; Whelan, F.J.; Puchta, A.; Ashu, E.; Rossi, L.; Surette, M.G.; Bowdish, D.M. (2016). *Streptococcus pneumoniae* colonization disrupts the microbial community within the upper respiratory tract of aging mice. *Infect. Immun*, 84, 906–916.

Tig, H., & Moschen, A. R. (2014). Microbiota and diabetes: An evolving relationship. *Gut*, 63, 1513–1521. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306928>

Torres, V.J., Ivie, S.E., McClain, M.S., Cover, T.L. (2005). Functional properties of the p33 and p55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 21107–21114.

Tshibangu-Kabamba, E., Yamaoka, Y. (2021). *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance—From biology to clinical implications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18, 613–629.

Tshikantwa, T.S., Ullah, M.U., He, F., Yang, G. (2018). Current trends and potential applications of microbial interactions for human welfare, *Frontiers in Microbiology*, 9:1156

Tso, G. H. W., Reales-Calderon, J. A., Tan, A. S. M., Sem, X., Le, G. T. T., Tan, T. G., Lai, G. C., Srinivasan, K. G., Yurieva, M., Liao, W., Poidinger, M., Zolezzi, F., Rancati, G., & Pavelka, N. (2018). Experimental evolution of a fungal pathogen into a gut symbiont. *Science*, 362, 589–595.

Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.M., Knight R., Gordon J.I. (2007). The human microbiome project. *Nature*. 449:804–810.

KAYNAKLAR (devam)

Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>

Uehling, J., Gryganskyi, A., Hameed, K., Tschaplinski, T., Misztal, P., Wu, S., Desirò, A., Vande Pol, N., Du, Z., Zienkiewicz, A. (2017). Comparative genomics of *Mortierella elongata* and its bacterial endosymbiont *Mycoavidus cysteinexigens*. *Environmental Microbiology*, 19, 2964–2983

Underhill D.M., Iliev I.D. (2014).The mycobiota: Interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 14:405–416.

van Leeuwen, P. T., van der Peet, J. M., Bikker, F. J., Hoogenkamp, M. A., Oliveira Paiva, A. M., Kostidis, S., Mayboroda, O. A., Smits, W. K., & Krom, B. P. (2016). Interspecies interactions between *Clostridium difficile* and *Candida albicans*. *mSphere*, 1, e00187-16.

Vangay, P., Johnson, A. J., Ward, T. L., Al-Ghalith, G. A., Shields-Cutler, R. R., Hillmann, B. M., Lucas, S. K., Beura, L. K., Thompson, E. A., Till, L. M., Batres, R., Paw, B., Pergament, S. L., Saenyakul, P., Xiong, M., Kim, A. D., Kim, G., Masopust, D., Martens, E. C., Knights, D. (2018). US immigration Westernizes the human gut microbiome. *Cell*, 175, 962–972.

Vesty A., Biswas K., Taylor M.W., Gear K., Douglas R.G. (2017). Evaluating the impact of DNA extraction method on the representation of human oral bacterial and fungal communities. *PLoS ONE*. 12:e0169877.

KAYNAKLAR (devam)

Vílchez, R., Lemme, A., Ballhausen, B., Thiel, V., Schulz, S., Jansen, R., Sztajer, H., & Wagner-Döbler, I. (2010). *Streptococcus mutans* inhibits *Candida albicans* hyphal formation by the fatty acid signaling molecule trans-2-decenoic acid (SDSF). *ChemBioChem*, 11, 1552–1562.

Violeta Filip, P., Cuciureanu, D., Sorina Diaconu, L., Maria Vladareanu, A., Silvia Pop, C. (2018). MALT lymphoma: Epidemiology, clinical diagnosis and treatment. *Journal of Medicine and Life*, 11, 187–193.

Vrbanac, A., Riestra, A. M., Coady, A., Knight, R., Nizet, V., & Patras, K. A. (2018). The murine vaginal microbiota and its perturbation by the human pathogen group B *Streptococcus*. *BMC Microbiology*, 18, 197.

Wang, F., Wang, Z., Tang, J. (2023). The interactions of *Candida albicans* with gut bacteria: a new strategy to prevent and treat invasive intestinal candidiasis. *Gut Pathogens*, 15(1):30.

Wang, Y.H., Gorvel, J.P., Chu, Y.T., Wu, J.J., Lei, H.Y. (2010). *Helicobacter pylori* impairs murine dendritic cell responses to infection. *PLoS ONE*, 5(5):e10844.

Wang, Y.H., Wu, J.J., Lei, H.Y. (2009). The autophagic induction in *Helicobacter pylori* infected macrophage. *Experimental Biology and Medicine*, 234(2):171–80.

Wang, Z.K.; Yang, Y.S.; Stefka, A.T.; Sun, G.; Peng, L.H. (2014). Fungal microbiota and digestive diseases. *Aliment Pharmacol. Ther.* 2014, 39, 751–766.

KAYNAKLAR (devam)

Weiland-Bräuer N. Friends or Foes-Microbial Interactions in Nature. (2021). Biology (Basel). Jun 2;10(6):496.

Weisman, L.S. (2003). Yeast vacuole inheritance and dynamics. Annual Review Of Genetics, Volume 37.

Wheeler, M.L.; Limon, J.J.; Underhill, D.M. (2016). Immunity to commensal fungi: Detente and disease. *Annu. Rev. Pathol.* 12,359–385.

White, S., McIntyre, M., Berry, D.R., McNeil, B. (2002) . The autolysis of industrial filamentous fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22, 1–14.

Witchley, J. N., Penumetcha, P., Abon, N. V., Woolford, C. A., Mitchell, A. P., & Noble, S. M. (2019). *Candida albicans* morphogenesis programs control the balance between gut commensalism and invasive infection. *Cell Host & Microbe*, 25, 432–443.

Wunder, C., Churin, Y., Winau, F., Warnecke, D., Vieth, M., Lindner, B., Zähringer, U., Mollenkopf, H.J., Heinz, E., Meyer, T.F. (2006). Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by *Helicobacter pylori*. *Nature Medicine*. 12(9):1030-8.

Xu H., Sobue T., Thompson A., Xie Z., Poon K., Ricker A., Cervantes J., Diaz P.I., Dongari-Bagtzoglou A. (2013). Streptococcal co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. *Cell Microb.* 16:214– 231.

KAYNAKLAR (devam)

Xu, H., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2015). Shaping the oral mycobiota: Interactions of opportunistic fungi with oral bacteria and the host. *Current Opinion in Microbiology*, 26, 65–70.

Xu, H., Sobue, T., Thompson, A., Xie, Z., Poon, K., Ricker, A., Cervantes, J., Diaz, P. I., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2014). Streptococcal co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. *Cellular Microbiology*, 16, 214–231.

Xu, H.; Sobue, T.; Bertolini, M.; Thompson, A.; Dongari-Bagtzoglou, A. (2016). *Streptococcus oralis* and *Candida albicans* synergistically activate γ -calpain to degrade E-cadherin from oral epithelial junctions. *The Journal of Infectious Diseases*. 2016, 214, 925–934.

Yamada, T., Alpers, D. H., Kaplowitz, N., Laine, L., Owyang, C., & Powell, D. W. (2009). Textbook of Gastroenterology. Wiley-Blackwell.

Yan, M.; Pamp, S.J.; Fukuyama, J.; Hwang, P.H.; Cho, D.-Y.; Holmes, S.; Relman, D.A. (2013). Nasal microenvironments and interspecific interactions influence nasal microbiota complexity and *S. aureus* carriage. *Cell Host Microbe*, 14, 631–640.

Yang, S., Anikst, V., Adamson, P.C. (2022). Endofungal *Mycetohabitans rhizoxinica* Bacteremia Associated with *Rhizopus microsporus* Respiratory Tract Infection. *Emerging Infectious Diseases*, Vol 28.

Yu, X.-Y., Fu, F., Kong, W. N., Xuan, Q. K., Wen, D. H., Chen, X. Q., He, Y. M., He, L. H., Guo, J., Zhou, A. P., Xi, Y. H., Ni, L. J., Yao, Y. F., & Wu,

KAYNAKLAR (devam)

W. J. (2018). *Streptococcus agalactiae* inhibits *Candida albicans* hyphal development and diminishes host vaginal mucosal TH17 response. *Frontiers in Microbiology*, 9, 198.

Zamani, M., Ebrahimitabar, F., Zamani, V., Miller, W.H., Alizadeh-Navaei, R., Shokri-Shirvani, J., Derakhshan, M.H. (2018). Systematic review with meta-analysis: The worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 47, 868–876.

Zanotti, G. Ve Cendron, L. (2019) Structural aspects of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1149, 227–241.

Zapata, H.J. ve Quagliarello, V.J. (2015). The microbiota and microbiome in aging: Potential implications in health and age-related diseases. *J. Am. Geriatr Soc*, 63, 776–781.

Zaura, E., Nicu, E.A., Krom, B.P., Keijser, B.J. (2015). Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: Current perspective. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 85.

Zhai, B., Ola, M., Rolling, T., Tosini, N.L., Joshowitz, S., Littmann, E.R., Amoretti, L.A., Fontana, E., Wright, R.J., Miranda, E., vd. (2020). High-resolution mycobiota analysis reveals dynamic intestinal translocation preceding invasive candidiasis. *Nature Medicine*, 26, 59–64.

Zhang, P., Huguet-Tapia, J., Peng, Z., Liu, S., Obasa, K., Block, A.K., White, F.R. (2024). Genome analysis and hyphal movement characterization of

KAYNAKLAR (devam)

the hitchhiker endohyphal *Enterobacter* sp. from *Rhizoctonia solani*. *Applied and Environmental Microbiology*. 20;90(3):e0224523

Zheng, W., Tan, T.K., Paterson, I.C., Mutha, N.V., Siow, C.C., Tan, S.Y., Old, L.A., Jakubovics, N.S., Choo, S.W. (2016). Streptobase: An oral *Streptococcus mitis* group genomic resource and analysis platform. *PLoS ONE*, 11, e0151908.

TEŞEKKÜR

Tezi konumun belirlenmesinde, hazırlanmasında, tez çalışmalarımın yürütülmesi sürecinde bana rehberlik eden, yol gösterici olan, bilgi ve deneyimlerini cömertçe paylaşan ve bilimsel araştırma etiğine olan bağlılığı ve akademik mükemmeliyet anlayışıyla bana ilham kaynağı olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezimde birlikte çalışmalar yapabilmek adına kendisiyle görüştüğümüzde bizi memnuniyetle karşılayan, tez konumun geliştirilmesine ilk günden itibaren katkı sağlayan, teşvik edici yaklaşımı, motive edici sözleri, doktora sürecindeki zorlukları atlatmama destek olan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, İç Hastalıkları Anabilim Dalı /Gastroenteroloji Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Nalan Gülşen ÜNAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda kullanmak üzere mesleki tecrübesi sayesinde hastalardan mide biyopsi örneklerinin alınmasını sabırla gerçekleştiren, bu konuda en büyük desteği olan Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bölümünden başta Uzman Dr. Altay İLDAN olmak üzere Uzman Dr. Ozan Fatih SARIKAYA'ya ve Dr. Öğr. Üyesi Abdullah Murat BUYRUK'a, aynı zamanda tez çalışmamda bana destek olan klinikteki hemşire arkadaşlarımdan canımın içi Halime OĞUZHAN ve Sabriye YAZAR KAYA'ya, Emel DOĞANYİĞİT, Emine ÇETİNTAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım konusunda önerilerde bulunana tez izleme komitesinin değerli hocaları, Prof. Dr. Hacı Halil BIYIK ve Prof. Dr. Ataç UZEL'e katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Birlikte çalışmalar yaptığımız kıymetli laboratuvar arkadaşlarım Bengi ALDI ve Bahar GÖKÇEN'e sonsuz teşekkür ederim.

Her zaman bana inanan, destekleyen, bana hayatı öğreten, değerler kazandıran ve her zaman doğru yolda yürümem için rehber olan hayattaki en büyük şansım ve hazinem annem ve babama sonsuz teşekkürler.

Çalışmamda kullandığım organizma tip türünü bizimle paylaşan Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD öğretim üyesi Prof. Dr. Yakut AKYÖN YILMAZ'a ve Araş. Gör. Neşe İNAL'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı ile sağlamış oldukları burs desteklerinden dolayı Yüksek Öğretim Kurum'una teşekkür ederim. Bu çalışma Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (FDK-2021-23381). Bu nedenle, Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Lisans eğitimini Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ABD’da tamamlamıştır (2009-2015). Lisans eğitimini zorunlu stajını Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Laboratuvarı’nda yapmıştır. Aynı bölümde 2015 yılında Yüksek Lisans eğitimine başlamıştır. (2015-2018) Yüksek lisans eğitimleri süresince mikrobiyal etkileşimler, bitki patojeni funguslar, endofungal birliktelikler, endofungal bakterilerle ilgili çalışmalarda yer almıştır. Yüksek lisans eğitiminde “ **İzmir İli İlçelerinin Tarım Arazilerinden Alınan Toprak Örneklerinden İzole Edilen *Rhizopus* genusu Üyelerinde Rhizoxin Üreticisi Endofungal Bakterilerin Varlığının Araştırılması**” isimli 116Z588 proje numaralı TÜBİTAK 3001 projesinde bursiyer öğrenci olarak çalışmıştır. 2018 yılında Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ABD’da doktora eğitimine başlamıştır. Doktora eğitimi boyunca YÖK 100/2000 “**Hastane Enfeksiyonu ve Antimikrobiyal Direnç**” Öncelikli Alanında bursiyerlik yapmıştır.

EK1

ETİK KURULU BELGESİ

Ege Üniv. Evrak Tarih ve Sayısı: 25.06.2021-E.207335



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-99166796-050.06.04-207335
Konu : Onay Kararı 21-6.1T/21

Doç. Dr. Nalan Gülşen Unal
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Gastroenteroloji Bilim Dalı

Kurulumuza başvurduğunuz " Midede Candida spp. içinde Helicobacter pylori varlığının araştırılması " konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmaktadır.

Başvuru dosyası kapsamında, araştırma giderlerinin Bilimsel Araştırma Proje Fonu (BAP) tarafından karşılanacağına ilişkin sunulmuş bulunan belge doğrultusunda, araştırmanızın desteklendiğine dair belgenin alınmasından sonra çalışmaya başlanması ve süreç içinde bu belgenin Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir.

Varsa Biyolojik Materyal Transfer Formu'nun imzaları tamamlanarak Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir. 10.04.2016 tarih ve 29680 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Tıbbi Laboratuvarlar Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmeliğin 34. maddesinde "yurtdışına tetkik amaçlı numune gönderme yetkisi sadece ruhsatlı tıbbi laboratuvarlara aittir" ifadesi yer almakta olup bu madde Klinik Araştırmalar için de yürürlüğe girmiştir. Gönderilen insan kaynaklı biyolojik materyal klinik araştırma için gönderilse bile ruhsatlı bir tıbbi laboratuvar aracılığı ile <http://numunetransfer.saglik.gov.tr> adresindeki numune transfer yazılımı kullanılarak gönderilmesi konusuna dikkat edilmelidir.

Yazınızın bir örneğinin diğer araştırma merkezlerine ve destekleyiciye iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Güzide AKSU
Kurul Başkanı

Ek:İlgili Etik Kurul Kararı (1 Adet aslı gibidir örneği elden gönderilecektir)

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : 85SM3H7HYNZ

Adres:Ege Üniversitesi Rektörlük Binası G. Cad. No:12 35040 Bornova/İzmir

Tel:0212 311 21 10 Faks:0212 339 90 90

Web:www.ege.edu.tr

Kap Adres:aguz@veritisi@egeuniv.ac.tr

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/eg-universitesi-ebys>

İmge için: Halide TATAR

Unvanı: Şef



Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TİBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
Tel : 0 232 390 2134 e-mail: etik@ege.edu.tr
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

Microsoft Teams Programı ile Teletoplantı gerçekleştirilmiştir.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Nidede Candida spp. içinde Helicobacter pylori varlığının araştırılması
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Nalan Gülşen Ünal
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Doç. Dr. ÖZLEM ABACI GÜNYAR Uzman Biyolog DERYA BİROL
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı
	DESTEKLEYİCİ	Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	-
	BİLGİLENDİRME FORMU	-
	VERİ İZLEME FORMU/ ANKET	☐
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒
	DİĞER	☐
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 21-6.1T/21	Tarihi: 24.06.2021
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekeceği, amaç, yaklaşımlar ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gündeşliye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenilmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğu toplantıda kabulan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

EGE ÜNİVERSİTESİ TİBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Gülside AKSU					
Unvanı / Adı / Soyadı (Etik Üyesi)	Ünvanlık Dalı	Kurumu	Onayladı	Bilgi (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Gülside AKSU Başkan	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLINE KATILDI
Doç. Dr. Tolga AKŞİT (Başkan Yardımcısı)	Antrenör Eğitimi - Hareket ve Antrenman Bilimleri	Ege Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi Hareket ve Antrenman Bilimleri AD	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLINE KATILDI
Dr. Öğr. Üyesi Aysun EKŞİOĞLU Üye (Raportör)	Etilik AD.	Sağlık Bilimleri Fakültesi Etilik Anabilim Dalı	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLINE KATILDI
Prof. Dr. Zeliha KERRY Üye	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLINE KATILDI
Prof. Dr. Aliye MANDERACTIOĞLU Üye	Halk Sağlığı AD	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLINE KATILDI



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
 Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat. - Erzincan Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
 Tel: 0 232 398 2134 e-mail: oba-etk@egeuniv.edu.tr
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

ARAŞTIRMACI ADI		Mikrobiyolojik, immünolojik, moleküler biyolojik, genetik ve diğer alanlardaki araştırmalar				
KARAR BİLGİLERİ		Karar No: 21-6.ET/21				
Unvan / Adı / Soyadı Ek Üyesi	Yönlendirici Özel	Kurumu	Onay	İzleni (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Süleyman ERGİN Öye	Çocuk Sağlığı	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	ONLİNE KATILIMCI
Prof. Dr. Ceylan KABARDÖLLÜ Öye	Ekliktik Biyokimya	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D., Klinik Biyokimya B.D.		☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILIMCI
Prof. Dr. Çiğdem ENER Öye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILIMCI
Prof. Dr. H. Öya TÜRNOĞLU Öye	Periodontoloji	Ege Üniversitesi Diş Hek. Fakültesi Periodontoloji A.D.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILIMCI
Prof. Dr. Meltem SEZİŞ DEĞİRCİ Öye	İç Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILIMCI
Prof. Dr. Şefik DAĞHAN Öye	Halk Sağlığı Halk Sağlığı A.D.	Ege Üniversitesi Halk Sağlığı Fakültesi Halk Sağlığı Halk Sağlığı A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILIMCI
Doç. Dr. Ahmet ÖZGÜREYENEL Öye	Klinik Hastalıklar ve Doçum	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doçum	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILIMCI
Doç. Dr. Banu Sarsak Kumburacı Öye	Patoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILIMCI
Doç. Dr. Mustafa Nuri Deniz Öye	Anestezi	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILIMCI
Doç. Dr. Tahir ATİK Öye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D. Çocuk	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILIMCI

* Araştırma ile ilgili

** Toplantıda Bulunma

** Toplantıda Bulunma

EK2

OLGU RAPOR FORMU

OLGU RAPOR FORMU

Araştırmanın Adı: Midede *Candida* spp. içinde *Helicobacter pylori* varlığının araştırılması

Araştırmacıya Katılacak Gönüllünün Genel Bilgileri

- Ad/Soyadı:
- Cinsiyet:
- TC:
- Protokol no:

Sigara-alkol alışkanlığı:

Eğitim Düzeyi:

Mesleği:

Alerji Öyküsü:

Beslenme alışkanlıkları:

Diş protezi olup olmadığı:

Kullandığı ilaçlar, son 1 haftadır antibiyotik kullandı mı?:

Ek hastalıklar:

Geçirilmiş ameliyatlar:

ÖGD yapılma nedeni:

Daha önce Hp tedavisi alıp almadığı:

Telefon Numarası:

Araştırmaya Dahil Edildiği Tarih: