

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROBİYAL KONDROİTİN SÜLFATIN ANTİFUNGAL ETKİSİNİN  
ÇEŞİTLİ *CANDIDA* SUŞLARINDA FARKLI ANTİMİKROBİYAL TEST  
YÖNTEMLERİ KULLANILARAK KARŞILAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Tuba ÜNVER

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşe Şebnem ERENLER

OCAK 2022

T.C  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROBİYAL KONDROİTİN SÜLFATIN ANTİFUNGAL ETKİSİNİN  
ÇEŞİTLİ *CANDIDA* SUŞLARINDA FARKLI ANTİMİKROBİYAL TEST  
YÖNTEMLERİ KULLANILARAK KARŞILAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Tuba ÜNVER  
(36183611024)

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşe Şebnem ERENLER

OCAK 2022

## TEŞEKKÜR

Canım Danışman Hocam Doç. Dr. Ayşe Şebnem ERENLER ile akademik hayatın zorluklarıyla başbaşa iken yolumuz kesişti. Yol gösterdi, yoluma gün ışığı oldu. Onun bilgisi ve tecrübeleriyle sadece doktora eğitimim değil hayatım şekillendi. Her daim inandı, güvendi bana. En sıkıntıda olduğum zamanlarda dahi yükümü hafifleterek ufkumu açtı. Hayatımdaki ‘İyi ki’lerimden olduğunuz için, sadece akademik çalışmalarına değil hayatıma dokunduğunuz için minnettarım size.

Doktora çalışmamın her aşamasında bana bilgisi ve tecrübesiyle yardımcı olan, eksiklerimi görmemde ve tamamlamamda yol göstericiliğiyle destek olan Sayın hocam Doç. Dr. Rauf MELEKOĞLU’na,

Lisans eğitimimden bu yana öğrencisi olduğum ve her zaman bilgi ve tecrübesinden faydalandığım ve çok sevdiğim naif, güler yüzlü kıymetli hocam Prof. Dr. Dilek ASMA hocama, ve bilgisini paylaşmada cömert olan ve öğrencisi olarak sorduğum her soruda ve bilgilenmek istediğim her alanda desteklerini esirgemeyen Sayın hocam Prof. Dr. Emre BİRHANLI’ya,

Tezimle ilgili değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan kıymetli hocalarım Prof. Dr. Süleyman KÖYTEPE ye, Doç. Dr. Tuğba Raika KIRAN’a ve Dr. Öğr. Üyesi Önder OTLU’ya,

Bu tez aşamasında FDK-2020-2354 nolu proje kapsamında maddi olarak destek sağlayan İnönü Üniversitesi BAP Birimine,

Tüm eğitim hayatı boyunca yanımda olan girdiğim her sınavın stresini benimle yaşayarak yaşanan fedakar anneme ve babama, benim derdimle dertlenen ve her duygumu benimle yaşayan kız kardeşim ve abime,

Yolumuzun kesiştiği günden bu yana birlikte bir ömür paylaştığım ve o günden bu yana bana her türlü desteği esirgemeyen, akademik hayatın verdiği yoğunluk ve sıkıntılara ortak olan ve yükümü hafifleten Canım eşime ve hayatımın can suyu, ciğerparem Canım oğluma,

sonsuz teşekkür ederim.

## ONUR SÖZÜ

Doktora tezi olarak sunduğum ‘‘Mikrobiyal Kondroitin Sülfatın Antifungal Etkisinin Çeşitli *Candida* Suşlarında Farklı Antimikrobiyal Test Yöntemleri Kullanılarak Karşılaştırılması’’ başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Tuba ÜNVER

## İÇİNDEKİLER

|   |          |
|---|----------|
| TEŞEKKÜR.....   | i        |
| ONUR SÖZÜ.....  | ii       |
| İÇİNDEKİLER.....  | iii      |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....  | v        |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....  | vi       |
| SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....   | ix       |
| ÖZET.....   | xii      |
| ABSTRACT.....   | xiii     |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>  | <b>1</b> |
| 1.1 Mikrobiyal Kondroitin Sülfat.....   | 1        |
| 1.2 Glikozaminoglikanlar (GAG).....   | 3        |
| 1.2.1 Hiyalüronik asit.....   | 4        |
| 1.2.2 Heparan sülfat ve heparin.....  | 5        |
| 1.2.3 Keratan sülfat.....   | 5        |
| 1.2.4 Dermatan sülfat.....  | 6        |
| 1.2.5 Kondroitin sülfat.....  | 6        |
| 1.3 Kondroitin Sülfatın Biyosentezi.....  | 8        |
| 1.4 Mikroorganizmaların Hücre Yüzey Polisakkaritleri.....                       | 13       |
| 1.5 <i>E. coli</i> Kapsüler Polisakkariti.....                                  | 14       |
| 1.6 <i>Vitreoscilla</i> Hemoglobin.....   | 16       |
| 1.7 Vajinal Mikroflora Elemanları.....  | 18       |
| 1.7.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....                                    | 22       |
| 1.7.2 <i>Lactobacillus. crispatus</i> .....                                     | 23       |
| 1.7.3 <i>Lactobacillus jensenii</i> .....                                       | 24       |
| 1.7.4 <i>Lactobacillus gasseri</i> .....  | 25       |
| 1.7.5 <i>Lactobacillus fermentum</i> .....                                      | 26       |
| 1.7.6 <i>Lactobacillus iners</i> .....  | 27       |
| 1.8 Vajinal Savunma Mekanizmaları.....  | 27       |
| 1.8.1 Laktik asit üretiminin önemi (vajinal pH).....                            | 27       |
| 1.8.2 Bakteriyosinler.....  | 28       |
| 1.8.3 Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....                   | 30       |
| 1.9 Vajinal Enfeksiyon Çeşitleri.....   | 30       |
| 1.9.1 Bakteriyel vajinoz (BV).....  | 31       |
| 1.9.2 Lenfoganüloma venereum (LGV) - <i>Chlamydia trachomatis</i> vajiniti..... | 32       |
| 1.9.3 Trikomonas vajiniti.....  | 33       |
| 1.9.4 Vajinal kandidiyazis.....   | 34       |
| 1.9.4.1 <i>Candida albicans</i> .....   | 36       |
| 1.9.4.2 Non- <i>albicans</i> <i>Candida</i> türleri.....                        | 38       |
| 1.10 Antifungal Ajanlar ve Etki Mekanizmaları.....                              | 42       |
| 1.10.1 Hücre sitoplazmik membran yapısını bozan antifungaller.....              | 42       |
| 1.10.2 Mantar hücre duvarlarına karşı aktif bileşikler.....                     | 42       |
| 1.10.3 Nükleik asitleri engelleyen antifungaller.....                           | 44       |

|   |            |
|---|------------|
| 1.11 KS ve Antimikrobiyal Etki Mekanizması .....  | 45         |
| <b>2. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>  | <b>47</b>  |
| 2.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar .....  | 47         |
| 2.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar .....   | 47         |
| 2.3 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar ve Saklama Koşulları .....                                     | 48         |
| 2.4 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri .....  | 48         |
| 2.5 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler .....   | 49         |
| 2.6 Rekombinant <i>E.coli</i> pETM6-PACF- <i>vgb</i> Suşunun Oluşturulması .....                          | 50         |
| 2.7 Mikrobiyal Kondroitinin Üretimi .....   | 52         |
| 2.8 Mikrobiyal Kondroitinin Sülfatlama Aşaması .....  | 55         |
| 2.9 Membran Aktivasyonu .....   | 56         |
| 2.10 Mikrobiyal KS'nin NMR Analizleri .....   | 56         |
| 2.11 Mikrobiyal KS'nin HPLC analizleri .....  | 57         |
| 2.12 Mikrobiyal KS'nin Antifungal Aktivitesinin Belirlenmesi .....  | 57         |
| 2.12.1 Antifungal aktivitenin agar dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmesi .....                       | 57         |
| 2.12.2 Antifungal aktivitenin broth dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmesi .....                      | 58         |
| 2.12.2.1 Resazurin .....  | 58         |
| <b>3. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>   | <b>60</b>  |
| 3.1 Mikrobiyal KS'nin NMR Analiz Sonuçları .....  | 60         |
| 3.2 Mikrobiyal KS'nin HPLC Analiz Sonuçları .....   | 62         |
| 3.3 Mikrobiyal KS'nin <i>C. albicans</i> 'a karşı Antifungal Aktivite Sonuçları<br>(Ön çalışma) .....     | 64         |
| 3.4 Mikrobiyal KS ve Ticari KS'nin <i>C. albicans</i> 'a karşı Antifungal Aktivite<br>Sonuçları .....     | 65         |
| 3.5 Mikrobiyal KS ve Ticari KS'nin <i>C. tropicalis</i> 'e karşı Antifungal Aktivite<br>Sonuçları .....   | 68         |
| 3.6 Mikrobiyal KS ve Ticari KS'nin <i>C. glabrata</i> 'ya karşı Antifungal Aktivite<br>Sonuçları .....    | 72         |
| 3.7 Mikrobiyal KS ve Ticari KS'nin <i>C. parapsilosis</i> 'e karşı Antifungal Aktivite<br>Sonuçları ..... | 76         |
| 3.8 Mikrobiyal KS ve Ticari KS'nin <i>C. krusei</i> 'ye karşı Antifungal Aktivite<br>Sonuçları .....      | 79         |
| 3.9 FT-IR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi) Analizleri .....                                  | 84         |
| <b>4. TARTIŞMA .....</b>  | <b>88</b>  |
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>   | <b>94</b>  |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>  | <b>96</b>  |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>   | <b>118</b> |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Çizelge 1.1:</b> KS üreten bakteriler ve ürettikleri KS miktarları.....                                  | 2  |
| <b>Çizelge 1.2:</b> Glikozaminoglikan çeşitlerinin yapısı ve bu yapıyı oluşturan disakkarit birimleri ..... | 4  |
| <b>Çizelge 1.3:</b> Kondroitin sülfat çeşitleri ve sülfatlanma modelleri.....                               | 11 |
| <b>Çizelge 2.1:</b> Kullanılan cihazlar .....   | 47 |
| <b>Çizelge 2.2:</b> MKS'nin antifungal etkinliği için kullanılan Mikroorganizma türleri .....               | 48 |
| <b>Çizelge 2.3:</b> LB besiyeri (g/L) .....   | 49 |
| <b>Çizelge 2.4:</b> Kondroitin saflaştırma protokolü için kullanılan parçalama tamponu .....                | 49 |
| <b>Çizelge 3.1:</b> Mikrobiyal KS ve ticari KS'nin MİK değerlerinin karşılaştırmalı sonuçları.....          | 84 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 1.1: Kondroitin sülfatın kimyasal formülü.....  | 7  |
| Şekil 1.2: (a) Kondroitin sülfatın yapısal formülasyonu, (b) Kondroitin sülfatın çeşitleri.....   | 9  |
| Şekil 1.3: <i>E.coli</i> bakterisinin a)Elektron mikroskop görüntüsü b) Hücre duvar yapısının, c) Lipopolisakkarit yapısının, ve d) Lipid A'nın şematik görüntüsü.....  | 14 |
| Şekil 1.4: Gram negatif bakterilerin hücre duvar yapısı .....   | 15 |
| Şekil 1.5: <i>vgb</i> geni taşıyan <i>E. coli</i> 'deki VHB'nin hücre içi lokalizasyonu.....  | 17 |
| Şekil 1.6: Normal vajinal floraya sahip kadınlardaki vajinal mikrobiomun yüzde olarak dağılımı .....  | 19 |
| Şekil 1.7: Vajinal florada bulunan <i>Lactobacillus</i> cinsi mikroorganizmaların tür dağılımı .....  | 20 |
| Şekil 1.8: <i>Lactobacillus</i> türlerinin 1. ve 24. saatteki Hela hücreleri yüzeyine yapışması gösteren Gram boyama örneği .....   | 22 |
| Şekil 1.9: <i>L. crispatus</i> 1.(A) ve 24.(B) saatteki vajinal epitel hücreleri yüzeyine yapışmasını gösteren Gram boyama örneği.....  | 24 |
| Şekil 1.10: (A) <i>E. coli</i> ve (C) <i>G. vaginalis</i> 'in <i>L. fermentum</i> suşu ile muamele edildikten sonra ok ile gösterilen yerlerdeki hasar görmüş (B) <i>E. Coli</i> ve (D) <i>G. vaginalis</i> 'in Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) görüntüleri..... | 26 |
| Şekil 1.11: Bakteriyosinlerin vajinal floraya katkıda bulunduğu mekanizmanın grafiksel çizimi .....   | 29 |
| Şekil 1.12: a) Normal vajinal floradan b) Vajinal kandidiyazisli hastadan) c) Bakteriyel vajinozisli hastadan d) Trikomonas vajiniti hastadan e) <i>C. trachomatis</i> vajiniti hastadan alınan örneklerin karşılaştırmalı Gram boyama sonrası görüntüleri.....     | 36 |
| Şekil 1.13: A. <i>C. albicans</i> 'in taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü B. <i>C. albicans</i> 'in Işık mikroskopundaki Gram boyama görüntüsü .....  | 37 |
| Şekil 1.14: <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> ve <i>C. tropicalis</i> 'nin Çikolatamsı agar üzerindeki 24. ve 48. saatlerdeki koloni görüntüleri .....   | 38 |
| Şekil 1.15: Kromagar üzerine ekimi yapılmış <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> ve <i>C. krusei</i> kolonileri .....  | 41 |
| Şekil 1.16: Mantar hücre duvar yapısı .....   | 43 |
| Şekil 1.17: Antifungallerin etki mekanizmaları .....  | 44 |
| Şekil 1.18: GAG'ların antimikrobiyal etkisi.....  | 46 |
| Şekil 2.1: <i>kfoA</i> , <i>kfoC</i> ve <i>kfoF</i> genlerini taşıyan pETM6-PACF plazmidi .....   | 50 |
| Şekil 2.2: <i>vgb</i> geni taşıyan pUC 8:15 plazmidi.....   | 51 |
| Şekil 2.3: Santrifüj tüpleri içerisindeki üzeri soğuk alkolle tamamlanmış süpernatantların -20 °C'ye konulmadan önceki resimleri .....  | 53 |
| Şekil 2.4: Yukarıdaki işlemlerle elde edilen kondroitinin spin kolon plastik kabı içerisindeki görüntüsü .....  | 54 |
| Şekil 2.5: Liyafilizatörde vakumla kurutulmuş Mikrobiyal Kondroitin .....   | 54 |

|  |    |
|--|----|
| Şekil 2.6: A: NaOH ile 2 saat muameleden sonraki hali; B: HCl damlattıktan sonraki hali.....   | 55 |
| Şekil 2.7: Liyofilizatörde vakum ile kurutulan Mikrobiyal Kondroitin Sülfat .....  | 56 |
| Şekil 2.8: Resazurin ve Resorufin ve Dihydro resorufinin kimyasal yapıları.....  | 59 |
| Şekil 3.1: <i>E. coli</i> pETM6-PACF- <i>vgb</i> <sup>+</sup> suşundan elde edilen Mikrobiyal KS'ye ait NMR sonuçları.....                                       | 61 |
| Şekil 3.2: Sığır trakesi kaynaklı kontrol ticari KS'ye ait NMR sonuçları .....   | 62 |
| Şekil 3.3: <i>E. coli</i> pETM6-PACF- <i>vgb</i> <sup>+</sup> suşundan üretilen KS'nin HPLC analiz sonuçları.....  | 63 |
| Şekil 3.4: Sığır trakesi kaynaklı kontrol ticari KS'ye ait HPLC analiz sonucu .....  | 64 |
| Şekil 3.5: Agar seyreltme yöntemi kullanılarak <i>C. albicans</i> 'a karşı farklı konsantrasyonlarda (g/mL) Mikrobiyal KS antifungal aktivite test sonuçları.... | 65 |
| Şekil 3.6: Farklı konsantrasyonlardaki Mikrobiyal KS'nin <i>C. albicans</i> üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları .....                                  | 66 |
| Şekil 3.7: Farklı konsantrasyonlardaki ticari KS'nin <i>C. albicans</i> üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları .....                                      | 67 |
| Şekil 3.8: Mikrobiyal KS'nin <i>C. albicans</i> 'a karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi .....            | 68 |
| Şekil 3.9: Ticari KS'nin <i>C. albicans</i> 'a karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi .....                | 68 |
| Şekil 3.10: Farklı konsantrasyonlardaki Mikrobiyal KS'nin <i>C. tropicalis</i> üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları.....                                | 70 |
| Şekil 3.11: Farklı konsantrasyonlardaki ticari KS'nin <i>C. tropicalis</i> üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları.....                                    | 71 |
| Şekil 3.12: Mikrobiyal KS'nin <i>C. tropicalis</i> 'e karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi .....         | 72 |
| Şekil 3.13: Ticari KS'nin <i>C. tropicalis</i> 'e karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi .....             | 72 |
| Şekil 3.14: Farklı konsantrasyonlardaki Mikrobiyal KS'nin <i>C. glabrata</i> üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları.....                                  | 73 |
| Şekil 3.15: Farklı konsantrasyonlardaki ticari KS'nin <i>C. glabrata</i> üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları.....                                      | 74 |
| Şekil 3.16: Mikrobiyal KS'nin <i>C. glabrata</i> 'ya karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi. ....          | 75 |
| Şekil 3.17: Ticari KS'nin <i>C. glabrata</i> 'ya karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi. ....              | 75 |
| Şekil 3.18: Mikrobiyal KS'nin <i>C. glabrata</i> karşı Saboraud Dekstroz Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi .....          | 75 |
| Şekil 3.19: Farklı konsantrasyonlardaki Mikrobiyal KS'nin <i>C. parapsilosis</i> üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları.....                              | 77 |
| Şekil 3.20: Farklı konsantrasyonlardaki ticari KS'nin <i>C. parapsilosis</i> üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları.....                                  | 78 |
| Şekil 3.21: Mikrobiyal KS'nin <i>C. parapsilosis</i> 'e karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi .....       | 79 |
| Şekil 3.22: Ticari KS'nin <i>C. parapsilosis</i> 'e karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi .....           | 79 |
| Şekil 3.23: Farklı konsantrasyonlardaki Mikrobiyal KS'nin <i>C. krusei</i> üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları.....                                    | 81 |
| Şekil 3.24: Farklı konsantrasyonlardaki ticari KS'nin <i>C. krusei</i> üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları .....                                       | 82 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Şekil 3.25:</b> Mikrobiyal KS'nin <i>C. krusei</i> 'ye karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikroplak resmi. ....   | 83 |
| <b>Şekil 3.26:</b> Ticari KS'nin <i>C. krusei</i> 'ye karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikroplak resmi. ....   | 83 |
| <b>Şekil 3.27:</b> A. Saboraud Dekstroz Agar besiyerine ekimi yapılmış <i>C. glabrata</i> (koloni-üreme gözlenmiştir), B. Muller Hinton Agar besiyerine ekimi yapılmış <i>C. glabrata</i> (koloni-üreme gözlenmemiştir). .... | 84 |
| <b>Şekil 3.28:</b> DKS1 numaralı çizgi distile su içerisindeki MKS'nin ilk saatteki FT-IR sonucunu göstermektedir. ....   | 85 |
| <b>Şekil 3.29:</b> SKS1 numaralı çizgi Saboraud Dekstroz Broth içerisindeki MKS'nin ilk saatteki FT-IR sonucunu göstermektedir. ....  | 86 |
| <b>Şekil 3.30:</b> MKS1 numaralı çizgi Muller Hinton Broth içerisindeki MKS'nin ilk saatteki FT-IR sonucunu göstermektedir. ....  | 86 |



## SEMBOLLER VE KISALTMALAR

|                      |  |
|----------------------|--|
| <b>°C</b>            | : Santigrat derece   |
| <b>g/L</b>           | : Litre başına gram  |
| <b>a/h</b>           | : Ağırlık/Hacim  |
| <b>rpm</b>           | : Dakikada dönme sayısı  |
| <b>kDa</b>           | : Kilo dalton  |
| <b>bp</b>            | : Baz çifti  |
| <b>µm</b>            | : Mikro metre  |
| <b>CFU</b>           | : Koloni oluşturan birim   |
| <b>pH</b>            | : Potansiyel hidrojen  |
| <b>HPLC</b>          | : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi                            |
| <b>NMR</b>           | : Nükleer Manyetik Rezonans  |
| <b>SEM</b>           | : Taramalı Elektron Mikroskobu                                       |
| <b>GlcN</b>          | : Glukozamin   |
| <b>GAG</b>           | : Glikozaminoglikan  |
| <b>UDP</b>           | : Üridin difosfat  |
| <b>GlcA</b>          | : Glukuronik asit  |
| <b>GalNAc</b>        | : N-asetilgalaktozamin   |
| <b>Xyl</b>           | : Ksiloz   |
| <b>Gal</b>           | : Galaktoz   |
| <b>IdoA</b>          | : İduronik asit  |
| <b>HA</b>            | : Hiyalüronik asit   |
| <b>DS</b>            | : Dermatan sülfat  |
| <b>KS</b>            | : Kondroitin sülfat  |
| <b>CSPG</b>          | : Kondroitin sülfat proteoglikanlar                                  |
| <b>EPS</b>           | : Ekzopolisakkarit   |
| <b>LPS</b>           | : Lipopolisakkarit   |
| <b>CPS</b>           | : Kapsüler polisakkarit  |
| <b>kfA,kfoC,kfoF</b> | : <i>E.coli</i> 'nin kapsüler kondroitin sentezinden sorumlu genleri |
| <b>vgb</b>           | : <i>Vitreoscilla</i> hemoglobin geni                                |

- VHb** : *Vitreoscilla* hemoglobin
- Ea[pUC8:15]** : *vgb* geni taşıyan rekombinant *E. aerogenes* bakterisi
- MİK** : Minimum İnhibitör Konsantrasyon
- BSE** : Bovine spongiform ensefalopati
- ECM** : Hücreler arası matriks
- OA** : Osteoartrit
- L. acidophilus***: *Lactobacillus acidophilus*
- L. cripatus*** : *Lactobacillus cripatus*
- L. jensenii*** : *Lactobacillus jensenii*
- L. gasseri*** : *Lactobacillus gasseri*
- L. fermentum*** : *Lactobacillus fermentum*
- L. iners*** : *Lactobacillus iners*
- L. plantarum*** : *Lactobacillus plantarum*
- L. minutus*** : *Lactobacillus minutus*
- L. brevis*** : *Lactobacillus brevis*
- L. catenaforme***: *Lactobacillus catenaforme*
- L. leichmannii***: *Lactobacillus leichmannii*
- L. salyarius*** : *Lactobacillus salyarius*
- L. casei*** : *Lactobacillus casei*
- L. vaginalis*** : *Lactobacillus vaginalis*
- L. delbrueckii***: *Lactobacillus delbrueckii*
- L. rhamnosus*** : *Lactobacillus rhamnosus*
- L. reuteri*** : *Lactobacillus reuteri*
- C. trachomatis***: *Chlamydia trachomatis*
- E. coli*** : *Escherichia coli*
- G. vaginalis*** : *Gardnerella vaginalis*
- T. vaginalis*** : *Trichomonas vaginalis*
- C. albicans*** : *Candida albicans*
- C. tropicalis*** : *Candida tropicalis*
- C. parapsilosis***: *Candida parapsilosis*
- C. glabrata*** : *Candida glabrata*
- C. krusei*** : *Candida krusei*
- S. pyogenes*** : *Streptococcus pyogenes*
- VK** : Vajinal kandidiyazis
- BV** : Bakteriyel vajinoz

|             |   |
|-------------|---|
| <b>LGV</b>  | : Lenfograduloma venereum                 |
| <b>CYBE</b> | : Cinsel yolla bulaşan enfeksiyon         |
| <b>HIV</b>  | : İnsan immun yetmezlik sendromu          |
| <b>NADH</b> | : Nikotinamid adenin hidroksi dinökleotid |
| <b>DMF</b>  | : Dimetil Formamid                        |
| <b>ATCC</b> | : Amerikan Tip Kùltür Koleksiyonu         |
| <b>LB</b>   | : Lauria broth besiyeri                   |
| <b>MHA</b>  | : Muller Hinton Agar besiyeri             |
| <b>MHB</b>  | : Muller Hinton Broth besiyeri            |



## ÖZET

Doktora Tezi

### MİKROBİYAL KONDROİTİN SÜLFATIN ANTİFUNGAL ETKİSİNİN ÇEŞİTLİ *CANDIDA* SUŞLARINDA FARKLI ANTİMİKROBİYAL TEST YÖNTEMLERİ KULLANILARAK KARŞILAŞTIRILMASI

Tuba ÜNVER

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

XIII+119 sayfa

2022

Danışman: Doç. Dr. Ayşe Şebnem ERENLER

Kondroitin sülfat (KS), hücre yüzeyinin ve hücrelerarası matriksin önemli bir bileşenidir. *N*-asetilgalaktozamin ve glukuronik asitin tekrarlayan disakkarit ünitelerinden oluşan bir glikozaminoglikandır (GAG)'dır. Tıp, veterinerlik, eczacılık ve kozmetik gibi alanlarda yaygın kullanıma sahiptir. Tezimizde, biyoteknolojik yöntemler kullanılarak rekombinant *E. coli* (C2987) suşundan ürettiğimiz Mikrobiyal KS'nin, mantar enfeksiyonlarının tedavisinde antifungal ajan olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla, yaygın enfeksiyon türlerinden, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* ve *Candida krusei* çalışılmış, her tür için Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir. Sonuç olarak, Mikrobiyal KS'nin çoğu mantar türü üzerinde belirgin antifungal etkinliği olduğu kanıtlanmıştır.

Vajinal flora, ~%75'ini *Lactobacillus*, ~%25'ini de diğer mikroorganizmaların oluşturduğu 250'den fazla mikroorganizmanın bulunduğu karmaşık bir mikrobiyotadır. Buradaki doğal ortamın çeşitli nedenlerle bozulması vajinal dokudaki GAG'ların da yapısını bozarak enfeksiyon etkeni patojenlere karşı savunmasız hale getirmektedir. Mikrobiyal KS biyoyumlu, toksik olmayan ve antialerjik özellikleri nedeni ile ve polianyonik bir polimer olarak önemli bir antifungal ajan potansiyeli taşımaktadır. Çalışmamızın sonucunda antifungal aktivitesi belirlenen Mikrobiyal KS hem vajinal bağ dokudaki GAG yapısını destekleyecek hem de burada oluşabilecek muhtemel Candidal enfeksiyonlarının önüne geçebilecektir.

Uyguladığımız antifungal testlerin sonuçları, Mikrobiyal KS'nin inhibitor etkisinin *C. albicans* ve *C. parapsilosis* ve *C. krusei*'ye karşı daha kuvvetli olduğunu göstermiştir. Bunu *C. tropicalis* takip etmektedir. Sonuç olarak, ürettiğimiz Mikrobiyal KS vajinal bağ dokudaki GAG yapısını destekleyecek ve oluşabilecek Candidal enfeksiyonların önüne geçebilecek potansiyeli taşımaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Mikrobiyal Kondroitin Sülfat, Antifungal aktivite, Vajinal kandidiyazis, *Candida* spp.

## ABSTRACT

Phd. Thesis

### COMPARISON OF THE ANTIFUNGAL EFFECT OF MICROBIAL CHONDROITIN SULFATE ON VARIOUS CANDIDA STRAINS USING DIFFERENT ANTIMICROBIAL TEST METHODS

Tuba ÜNVER

Inonu University  
Graduate School of Nature and Applied Sciences  
Department of Biology

XIII+119 sayfa

2022

Supervisor: Assoc. Prof. Ayşe Şebnem ERENLER

Chondroitin sulfate (CS) is an essential component of the cell surface and extracellular matrix. It is a glycosaminoglycan (GAG) composed of repeating disaccharide units of *N*-acetylgalactosamine and glucuronic acid. It is widely used in medicine, veterinary medicine, pharmacy, and cosmetics. In this thesis, the usability of Microbial CS, which we produced from recombinant *E. coli* (C2987) strain using biotechnological methods, was investigated as an antifungal agent in treating fungal infections. For this purpose, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, and *Candida krusei* were studied, and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values were determined for each species. In conclusion, Microbial CS has shown significant antifungal activity against most yeast strains.

Vaginal flora is a complex microbiota of more than 250 microorganisms, of which ~75% is *Lactobacillus*, and ~25% is other microorganisms. The deterioration of the natural environment here for various reasons also disrupts the structure of GAGs in the vaginal tissue, making it vulnerable to infectious pathogens. Microbial CS has the potential to be an important antifungal agent due to its biocompatible, nontoxic, and antiallergic properties and as a polyanionic polymer. Microbial CS, whose antifungal activity was determined as a result of our study, will both support the GAG structure in the vaginal connective tissue and prevent possible Candidal infections that may occur here.

The results of the antifungal tests we performed showed that the inhibitory effect of Microbial CS was more substantial against *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*, followed by *C. tropicalis*. As a result, Microbial CS we produce can support the GAG structure in the vaginal connective tissue and prevent Candidal infections.

**Keywords:** Microbial Chondroitin Sulfate, Antifungal activity, Vaginal candidiasis, *Candida* spp.

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Mikrobiyal Kondroitin Sülfat

Kondroitin Sülfat (KS),  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  3) glikozidik bağlar ile bağlanmış *N*-asetil-galaktozaminin (GalNAc) ve glukuronik asitin (GlcA) tekrarlayan disakkarit birimlerinden oluşan farklı sülfat desenleri gösterebilen polimerik bir karbonhidrattır. KS, antienflamatuar, antikoagülan, antitrombotik, antioksidan etkiye sahip, kemik ve kıkırdak oluşumunu destekleyen, kemik iyileşmesini artıran, tümör büyümesini ve metastazı engelleyen, kan lipidlerini düzenleyen, santral sinir sisteminin onarımını ve rejenerasyonunu sağlayan ekstrasellüler matriksin önemli bir bileşenidir (Erin ve diğ, 2018; Bobula ve diğ, 2018; Bougatef ve diğ, 2018; Yu ve diğ, 2017). KS'nin çeşitli biyomedikal alanlardaki bu hayati rolü ve yaygın kullanımı, tüm dünyada KS'nin üretimini cazip bir araştırma konusu haline getirmiştir. Çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin ve mantarların, patogenezi devam ettirmek amaçlı konakçı Glikozaminoglikan (GAG) yapısını taklit ederek oluşturduğu kapsüler polisakkaritin üretilmesiyle Mikrobiyal KS elde edilmektedir (Schiraldi ve diğ, 2010). Dolayısıyla, mikroorganizmanın bu özellikleri kullanılarak, KS'nin mikrobiyal fermentasyon sonucu üretimi gerçekleştirilmektedir.

Ticari olarak temin edilen GAG'ların çoğu, kanatlılar, yumuşakçalar, köpek balığı kıkırdağı, domuz, koyun ve diğer memelilerin trakea ve nazal septaları gibi hayvansal kaynaklardan elde edilmektedir. Ancak, Sığıır süngerimsi ensefalopati (BSE), H7N9 kuş gribi ve diğer gıda zinciri krizlerinden kaynaklanan ve arakonak olarak çeşitli hayvanlar üzerinden bulaşa sebep olan çeşitli patojenlerin varlığının bir sonucu olarak, bu glikokonjugatların kaynağı olarak mikroorganizma ve deniz organizmalarının araştırılmasına ilgi artmıştır (Shi ve diğ, 2014; Schiraldi ve diğ, 2010). Son zamanlarda, araştırmacıların çoğu hayvansal kaynaklı KS'nin taşıyabileceği tüm bu riskleri gözönüne alarak, KS'nin üretimini, çeşitli mikrobiyal kaynaklardan biyoteknolojik olarak veya kimyasal sentez yöntemleri kullanarak sağlamaktadır. Dolayısıyla, araştırmacılar düşük ürün verimi ve ürün kalitesi, nihai ürünlerdeki kusurlar, karmaşık ve pahalı saflaştırma yöntemleri, sterilizasyondaki dezavantajlar, büyük miktarlarda organik kimyasallar ve

protein atıklarından kaynaklanan ciddi kirlilik gibi çeşitli dezavantajları elimine etmek için esas olarak daha verimli yöntemler olarak düşündükleri iki ana yol izlemektedirler. Bunlardan biri, enzimatik reaksiyonlarla sentetik KS üretmek, diğeri ise fermentatif üretim süreçleriyle Mikrobiyal KS üretmektir. Kimyasal sentez yöntemleri birden fazla adım içermektedir ve saflık oranı düşüktür. Ancak, Mikrobiyal fermentatif üretim süreçleri ile daha saf, kaliteli ve verimli KS elde edilmektedir (Badri ve diğ, 2021; Jolly ve diğ, 2010). Çizelge 1.1’te KS üretilen bakteriler ve mL’de ürettikleri KS miktarları verilmiştir.

**Çizelge 1.1:** KS üreten bakteriler ve ürettikleri KS miktarları (Jolly ve diğ, 2010)

| Bakteri türü                      | KS (ng/mL) |
|-----------------------------------|------------|
| <i>Bacillus cereus</i>            | 8.6        |
| <i>Bacillus circulans</i>         | 11.7       |
| <i>Bacillus coagulans</i>         | 8.5        |
| <i>Bacillus licheniformis</i>     | 9.0        |
| <i>Bacillus megaterium</i>        | 8.8        |
| <i>Bacillus subtilis</i>          | 8.9        |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i>  | 8.9        |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> | 80.8       |
| <i>Microbacterium arborescens</i> | 8.0        |
| <i>Micrococcus varians</i>        | 8.7        |
| <i>Monascus purpureus</i>         | 10.1       |
| <i>Streptomyces</i>               | 8.3        |
| <i>Olivochromogenes</i>           | -          |
| <i>Streptomyces rubiginosus</i>   | 8.0        |
| <i>Escherichia coli</i>           | 8.8        |

## 1.2 Glikozaminoglikanlar (GAG)

Glikanlar (polisakkaritler), hücrelerin dört temel bileşeninden biridir ve aynı zamanda doğadaki biyopolimerlerin en bol ve çeşitli olanıdır. Biyolojik sistemlerdeki kütle ve yapısal çeşitliliğin önemli miktarını oluşturmaktadır (Ohtsubo ve Marth, 2006). Glikanlar, hem bakterilerde hem de ökaryotik hücrelerde önemli yapısal işlevlere sahiptir. Hücre yapışması, tanıma, reseptör aktivasyonu, sinyal iletimi ve endositoz gibi birçok önemli biyolojik süreçte yer almaktadır. Bakteriyel glikanlar farklı hücre duvarı yapılarından kaynaklandığı düşünülen bir çeşitlilik göstermekte ve virülans, ozmoproteksiyon faktörleri olarak işlev görmektedir (Herget ve diğ, 2008).

Glikozaminoglikanlar hücre büyümesinde ve çoğalmasının düzenlenmesinde, hücre yapışmasının teşvik edilmesinde, pıhtılaşmayı önlemede ve yara onarımında önemli rol oynamaktadır. Glikozaminoglikanlar çekirdek disakkarit birimlerine göre sınıflandırılarak 4 ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar heparin/heparan sülfat, kondroitin sülfat/dermatan sülfat, keratan sülfat ve hiyalüronik asit olarak tanımlanmaktadır (Casale ve Crane, 2021).

"Gliko-" öneki, bir aminoglikan veya amino şekere (*N*-asetilglukosamin veya *N*-asetilgalaktozamin) bağlı galaktoz veya üronik şeker (glukuronik asit veya iduronik asit) anlamına gelmektedir. Memeli hücrelerindeki GAG biyosentezi, hücresel sitoplazmada beş üridin difosfat (UDP) türevli aktive edilmiş şekerlerin sentezi ile başlar. Bu UDP ile aktive olan şekerler daha sonra daha fazla modifikasyon için bir antiporter transmembran taşıyıcısı yoluyla sitoplazmadan Golgi aparatına taşınır. İstisna olarak glikozaminoglikanlardan hiyalüronik asit (HA) golgi aparatında modifikasyona ve sülfasyona uğramak yerine, HA öncü şekerleri sitoplazmadan plazma membranına taşınır ve bu da sülfatlama olmaksızın HA üretimine yol açar. Diğer tüm GAG'lar, Golgi aygıtının içinde ve çevresinde fonksiyonel grupların sülfatlanması da dahil ek modifikasyonlar geçirmektedir. Monosakkaritlerin tipindeki farklılıklar ve sülfatlama modeli ile ilgili modifikasyonlar; GAG'ları, hiyalüronik asit, heparin/heparan sülfat, kondroitin sülfat/dermatan sülfat ve keratan sülfat gibi dört farklı kategoriye ayırmaktadır (Çizelge 1.2.) (Casale ve Crane, 2021).

**Çizelge 1.2:** Glikozaminoglikan çeşitlerinin yapısı ve bu yapıyı oluşturan disakkarit birimleri (Casale ve Crane, 2021)

| Glikozaminoglikan (GAG)      | Tekrarlayan Disakkarit Birimi                      |  |
|------------------------------|--|--|
|                              | Heksuronik asit                                    | Heksozamin   |
| Hiyalüronik asit             | Glukuronik asit                                    | <i>N</i> -Asetil Glukozamin  |
| Kondroitin sülfat            | Glukuronik asit<br>(2. ve/veya 3. Karbon sülfatlı) | <i>N</i> -Asetil Galaktozamin<br>(4. ve/veya 6. Karbon sülfatlı)             |
| Dermatan sülfat              | İduronik asit veya<br>Glukuronik asit              | <i>N</i> -Asetil Glaktozamin<br>(4. Karbon sülfatlı)                         |
| Heparan sülfat ve<br>Heparin | İduronik asit veya<br>Glukuronik asit              | <i>N</i> -Asetil veya <i>N</i> -sülfat<br>Glukozamin<br>(6. Karbon sülfatlı) |
| Keratan sülfat               | Galaktoz   | <i>N</i> -Asetil Glukozamin<br>(6. Karbon sülfatlı)                          |

### 1.2.1 Hiyalüronik asit

Hiyalüronik asit (HA), hücre dışı matriksteki en bol bulunan yapısında sülfat bulunmayan, en basit yapıdaki GAG'dır. Diğer GAG'lar gibi Golgi aygıtındaki fonksiyonel grupların ilave sülfatlanmasını gerektirmez. Sırasıyla bağlı glukuronik asit ve *N*-asetilglukozamin'den oluşan doğrusal bir polisakkarittir (Gerdin ve Hällgren, 1997). Bu monosakkarit yapı taşları hücre sitoplazmasında sentezlenmekte ve HA sentezi için difüzyon yoluyla plazma zarına alınmaktadır. HA, plazma zarı içinde sentezlendikten sonra, diğer GAG'lardan farklı olarak, hücreden hücre dışı boşluğa değiştirilmeden salgılanır (Casale ve Crane, 2021).

HA, vücut dokularında her yerde bulunmaktadır ve en iyi su moleküllerini çekme kabiliyeti ile bilinmektedir. HA'nın son derece polar yapısı nedeniyle suda kendi

ağırlığının 10.000 katını bağlayabilmektedir. Bu nedenle sinovyal eklemlerin yağlanması ve yara iyileşme süreçlerinde kilit rol oynamaktadır. HA ayrıca klinisyenler tarafından doku rejenerasyonunu ve cilt onarımını desteklemek için eksojen olarak kullanılmaktadır (Litwiniuk ve diğ, 2016).

### **1.2.2 Heparan sülfat ve heparin**

Heparin ve heparan sülfat, *N*-asetilglukozamin ve heksuronik asitin tekrarlayan disakkarit ünitelerinden oluşmaktadır. Heparin ve heparan sülfatın glukozamin bileşiği üzerinde bulunan çeşitli hidroksil gruplarının veya amino grubunun sülfatlanması, biyolojik işlevini belirlemektedir. Bu fonksiyonel gruplar sayesinde çeşitli proteinler, sitokinler ve büyüme faktörleri ile etkileşime girme yeteneği kazanmaktadır. Heparin, heparan sülfatın modifiye edilmiş şeklidir ve heparan sülfatın aşırı sülfatlı bir hücre içi varyantıdır. Heparin aynı zamanda hastalarda yaygın olarak antikoagülan olarak kullanılmaktadır (Souza-Fernandes ve diğ, 2006).

Heparan sülfat, birçok biyoaktif rolü ve kanser tedavisi için farmakolojik bir hedef olarak potansiyel kullanımı nedeniyle en iyi çalışılmış GAG'lardan biridir. Heparan sülfat, hücre dışı matriks (ECM) organizasyonu sağlamakta, aynı zamanda reseptörler ve ligandlar arasında bir köprü görevi görerek hücrel büyüme faktörü sinyalleşmesinin modülasyonunu sağlamaktadır. Hücre dışı matrikste, heparan sülfat, hücreden hücreye ve hücreden hücre dışı matrikse yapışmayı teşvik etmek için kolajen, laminin ve fibronektin dahil birçok bileşikle etkileşime girmektedir. Hücre dışı matrikste heparan sülfatın bozulması, malign hücrelerin göçüne ve metastaza yol açar. Bu mekanizma, kanser metastazının önlenmesi için heparan sülfatı uygulanabilir farmakolojik hedefler haline getirmektedir (Casale ve Crane 2021). Heparan sülfat ayrıca hücrel büyüme faktörü sinyalleşmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Heparin, aynı zamanda bir antikoagülan olarak kullanılmasıyla GAG'ların bilinen en eski biyolojik rolünü temsil etmektedir (Knelson ve diğ, 2014; Jin ve diğ, 1997).

### **1.2.3 Keratan sülfat**

Keratan sülfat, galaktoz ve *N*-asetilglukozaminden oluşan disakkarit tekrarından oluşmaktadır. Keratan sülfat, hem kornea hem de sinir sisteminde önemli işlevsel role sahiptir. Kornea, vücutta bilinen en zengin keratan sülfat kaynağını oluşturmakta ve bunu beyin dokusu izlemektedir. Keratan sülfat, korneada optik netlik için gerekli olan kolajen fibril aralığının düzenlenmesini sağlamaktadır (Funderburgh 2000). Bunun yanı sıra, su

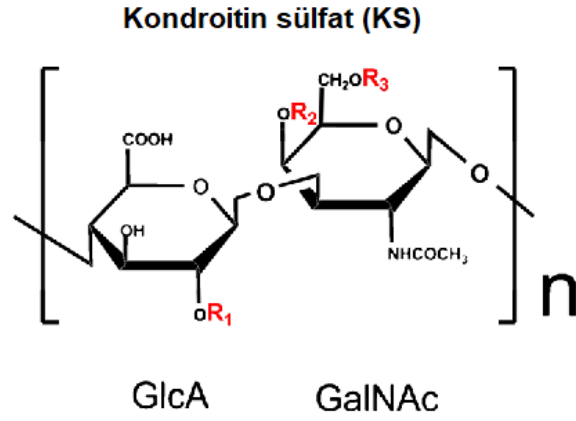
molekülleri ile etkileşimine dayalı olarak kornea hidrasyonunun optimizasyonunu gerçekleştirmektedir. Diğer GAG'larda olduğu gibi, keratan sülfatın sülfatlaşma derecesi fonksiyonel durumunu belirlemektedir. Keratan sülfatın spesifik genetik mutasyonlara bağlı anormal sülfatlaşma paternleri, korneanın opasitesinin artmasına ve sonuçta görme bozukluklarına neden olmaktadır. Keratan sülfat ayrıca sinir dokusunun gelişiminde önemli bir düzenleyicidir (Funderburgh 2000, 2002).

#### **1.2.4 Dermatan sülfat**

Dermatan sülfat (DS), yapısal olarak HS'ye benzer. Disakkarit zincirleri, 50-200 tekrar içeren *N*-asetilgalaktozamin ve heksuronik asitlerden oluşmaktadır (iduronik asit veya glukuronik asit). Heparan sülfat ve Heparine benzer şekilde, Golgi aygıtında yer alan DS'nin sülfatlaşma modeli, ortaya çıkan bileşiğin biyolojik aktivitesini belirlemektedir. Kıkırdakta, ciltte ve aortta bol miktarda bulunmaktadır. Bunların dışında, beyin, akciğer, karaciğer, böbrek ve kalp gibi çeşitli dokularda bulunmaktadır. Hücre dışı matrikslerin toplanması, büyüme faktörleri, bağlama yoluyla sinyal iletimi, pıhtılaşma ve yara iyileşmesinde görev almaktadır (Neill ve diğ, 2015; Mizumoto, 2017).

#### **1.2.5 Kondroitin sülfat**

Kondroitin sülfat (KS), insanlarda, diğer memelilerde ve omurgasızlarda ve ayrıca bazı bakterilerde yaygın olarak bulunan,  $\beta$ -(1→3) glikozidik bağlar ile bağlanmış, farklı karbon pozisyonlarında sülfatlanmış (Sülfatsız KS, KS-O'dur), *N*-asetilgalaktozamin ve glukuronik asitin tekrarlayan disakkarit zincirlerinden oluşan bir GAG'dır (Şekil 1.1.). KS, hem hücre yüzeyinin hem de hücre dışı matriksin önemli bir bileşeni olmakla beraber, direnç ve elastikiyet gibi kıkırdağın önemli biyomekanik özelliklerinin çoğundan sorumlu polimerik karbonhidrattır. (Henrotin ve diğ, 2010). Taşıyıcı proteinlere bağlı olan KS'nin polisakkarit zincirleri sayısı 10 ile 200 arasında değişen tekrarlı birimlerden oluşmaktadır. KS, eklem kıkırdağında en çok bulunan GAG'dır (Akgün ve Öğüt, 2002). KS vücutta bulunduğu dokuya göre çeşitli sülfat desenlerine sahiptir ve sülfatlaşma modeline bağlı olarak biyolojik aktivitesi değişmektedir. Bağ dokusu hücre dışı matriksinin, elastikiyetini ve diğer işlevlerini sağlayan önemli bir bileşendir. KS, nispeten yüksek moleküler ağırlık ve yük yoğunluğu ile heterojen GAG ailesinin bir üyesidir (Tuan, 2004).



**Şekil 1.1:** Kondroitin sülfatın kimyasal formülü (Wang ve diğ. 2016)

KS, diğer biyomoleküllerle spesifik etkileşimlere imkan veren bir fonksiyonel grup çeşitliliğine sahiptir. Bu tür etkileşimler, farklılaşma ve gelişme dahil olmak üzere birçok önemli hücresel süreci düzenlemekte ve KS'nin sağlık ve hastalığındaki rolünü belirlemektedir (Badri ve diğ. 2021). KS, klinikte yaygın olarak osteoartrit tedavisinde kullanılmaktadır. Klinik deneyler, radyografik eklem bulgularına dayalı olarak osteoartritte (OA) iyileştirici etkisinin yanı sıra semptomatik ağrı kesici özelliğini de belgelemektedir. KS'nin bu klinik etkilerini oluşturan birçok mekanizma vardır. KS'nin OA'daki ağrı giderici özellikleri, OA'da aşırı aktif olan nükleer faktör-kappa-B yolunun zayıflamasına neden olan anti-inflamatuar özellikleri ile ilgilidir (Cañas ve diğ, 2010). OA'nın patofizyolojik nedenlerinden biri, eklemlerdeki eklem kıkırdağından KS'nin kaybıyla ilgilidir, bu da kıkırdak ve subkondral kemiğin iltihaplanmasına ve katabolizmasına yol açmaktadır. KS'nin anabolik etkisi, daha fazla doku hasarını ve sinovyal dokuların yeniden şekillenmesini önlemektedir (Casale ve Crane, 2021).

KS, bağ dokusu metabolizmasında yer alan hücre dışı proteazların bir inhibitörüdür. Anabolik aktiviteyi artırarak ekstraselüler matriksin aşırı bozulmasını engellemektedir. Böylece, hücreler arası boşluğun bütünlüğünü koruyarak yapısal bir modülatör görevi görmektedir (Bayliss ve diğ, 1999). Bu nedenle, KS'nin azalması, ECM bileşenlerinin daha yüksek bir bozunması ve düzensizliği ile proteazlarındaki artışla ilişkilendirilebilir. Vajinal dokunun ekstraselüler matriksinde bulunan sülfatlanmış GAG'larda dermatan sülfat baskındır ve bunu KS ve heparan sülfat takip etmektedir. Yapılan bir çalışmada, postmenopozal kadınlarda premenopozal kadınlara göre, kondroitin sülfatla birlikte heparan sülfat ve dermatan sülfatın da anlamlı derecede azaldığı görülmektedir. KS ve diğer GAG'larda belirlenen bu azalmanın doğumlarla birlikte meydana gelen doku kaybı ve hasarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Bezerra ve diğ, 2004). Yapılan başka bir

çalışmada, vajinal kuruluğa sahip olan hastalarda tedavi amaçlı glukozamin sülfat ve KS içerikli preparat kullanılmış ve hastalarda önemli miktarda iyileşme gözlenmiştir (Torella ve diğ, 2016).

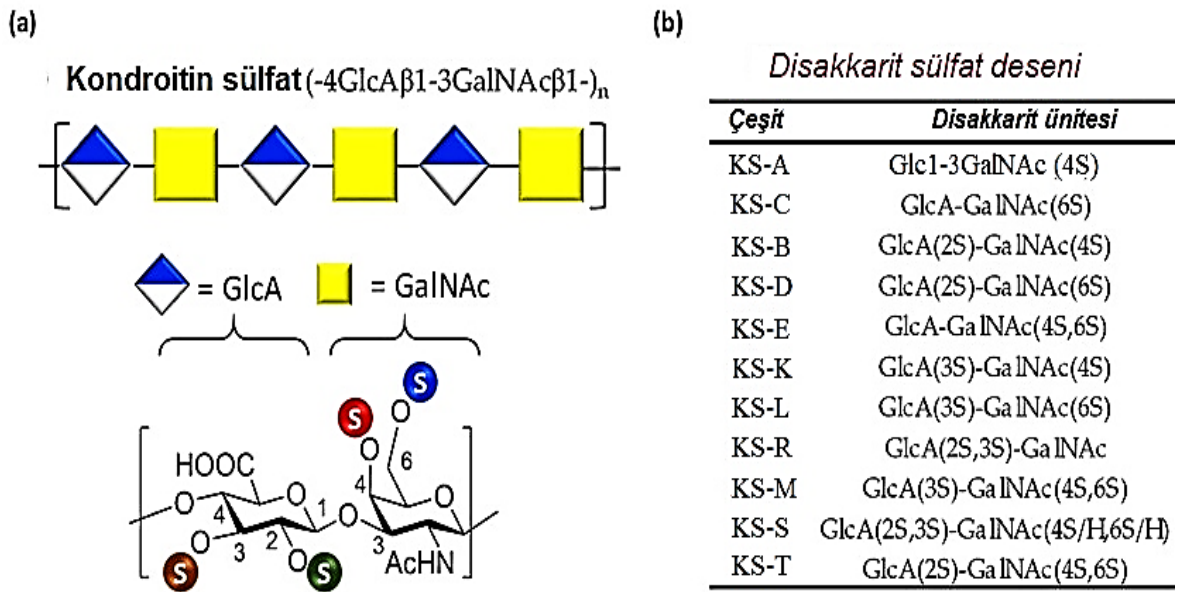
Östrojenler, laktobasiller tarafından kullanılan glikojenin sentezi ve birikiminin yanı sıra vajinal epitelinin büyümesini ve olgunlaşmasını desteklemekte ve ayrıca bağışıklık faktörlerinin (immünoglobulinler) ve GAG'ların (hiyalüronik asit, kondroitin sülfat, glikoproteinler) sentezini sağlamaktadır. Vajinal epitelden glikojenin salınma süreci, vajen epitelinin ara katmanlarının oluşumuna ve yenilenmesine katkıda bulunan progesteronun etkilerine bağlıdır (Orazov ve diğ, 2020; Tyuzikov ve diğ, 2018). Bununla birlikte, kadınlarda üretranın ve mesanenin doğal antibakteriyel koruması, progesteron olmadan imkansızdır. Bu durum östrojenlerin mesanenin ürotelyumundaki GAG'ların sentezini etkilemesiyle ilişkilidir, progesteron, GAG'ların ürotelyumdan mesane lümenine salınmasını sağlamaktadır (Orazov ve diğ, 2020; Clemons ve diğ, 2002).

### **1.3 Kondroitin Sülfatın Biyosentezi**

Kondroitin sülfat proteoglikanlar (KSPG'ler), sayısız biyolojik ve patofizyolojik olayı içeren düzenleyici ortamı oluşturan temel hücre içi ve hücre dışı bileşenlerdir. KSPG'lerin çeşitli işlevleri, esas olarak polisakkarit kısımlarının, kondroitin sülfat glikozaminoglikanlarının (KS-GAG) yapısal değişkenliğine bağlıdır (Mikami ve Kitagawa, 2013). Bu işlevleri anlamak için KS biyosentezi ve katabolik süreçlerin anlaşılması gerekmektedir. Çeşitli dokulardaki KS zincirlerinin boyutu ve sayısı, aynı zamanda sülfatlaşma konumu ve derecesi de önemli ölçüde değişmektedir. Bu tür yapısal çeşitlilik, KS'lerin çok yönlü işlevlerine katkıda bulunmaktadır (Mikami ve Kitagawa, 2013).

KS zincirlerinin birleşmesi endoplazmik retikulum ve Golgi kompartmanlarında meydana gelmektedir. KS zinciri, GAG-protein bağlantı bölgesi olarak adlandırılan GlcA $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ 1-O-Ser'in sentezi ile başlatılır ve farklı çekirdek proteinlere gömülü serin kalıntılarına kovalent bağlarla bağlanarak devam etmektedir (Uyama ve diğ, 2007; Silbert ve Sugumaran, 2002; Sugahara ve Kitagawa, 2000). Bağlantı bölgesinin tetrasakkarit yapısı, tek tek monosakkarit birimlerinin, tek Xyl (ksiloz), iki ardışık Gal (galaktoz) ve tek GlcA (Glukuronik asit) tortusunun spesifik glikosiltransferazlar tarafından sırayla adım adım eklenmesi yoluyla birleştirilmektedir. GalNAc (*N*-asetilgalaktozamin) transferaz I enzimi tarafından tetrasakkarit bağlantı bölgesindeki indirgeyici olmayan terminal GlcA tortusuna ilk GalNAc transferi, kondroitin omurgasının

sentezini başlatmaktadır. (Bai ve diğ, 2001; Kitagawa ve diğ, 1998). Kondroitin omurgası, sülfatlama ve epimerizasyon ile modifiye edilmektedir (Malmström ve diğ, 2012; Uyama ve diğ, 2007; Kusche-Gullberg ve Kjellén 2003). Çoklu sülfotransferazlar tarafından, esas olarak GlcA'nın C-2 pozisyonunda ve GalNAc kalıntılarının C-4 ve/veya C-6 pozisyonlarında sülfat grupları eklenebilmektedir. Sonuç olarak, disakkarit birimlerinin çeşitli kombinasyonları ile KS-O, KS-A, KS-C, KS -E ve vb. çeşitli KS yapıları oluşmaktadır (Şekil 1.2.). Ayrıca GlcA'nın iduronik aside (IdoA) epimerizasyonu ile de KS dermatan sülfata dönüştürülebilmektedir (Pacheco ve diğ, 2009; Maccarana ve diğ, 2006). KS biyosentezinden sorumlu her biyosentetik enzim, hücre tipine özgü ekspresyon paterni gösterdiğinden, tek bir türden izole edilen KS zincirlerinde bile önemli ölçüde heterojenlik mevcuttur, bu da potansiyel olarak KSPG'lerin fonksiyonel çeşitliliğine yol açmaktadır.



**Şekil 1.2:** (a) Kondroitin sülfatın yapısal formülasyonu, (b) Kondroitin sülfatın çeşitleri (Vessella ve diğ, 2021)

KS zincirlerinin tekrarlayan disakkarit bölgesindeki indirgeyici olmayan terminal şeker kalıntılarının yapısal özellikleri, zincir uzamasının nasıl sona erdiği hakkında fikir verebilir. Örneğin, sıçan KSPG agrekan preparatları üzerindeki KS zincirlerinin kimyasal analizi, büyük çoğunluğunun, iç disakkaritlerdekinden 60 kat daha fazla olan 4,6- O-disülfatlanmış GalNAc kalıntıları ile sonlandığını göstermektedir (Midura ve diğ, 1995). İlginç bir şekilde, insanlarda intrauterin hayattan 72 yaşına kadar diz kırıkdağlarından izole edilen insan agrekan preparatlarının KS zincirlerinde, 4,6- O ile biten zincirlerin oranı-disülfatlanmış GalNAc kalıntısı 15 yaşından sonra kademeli olarak artarken, ortalama zincir uzunlukları yaşla birlikte giderek kısalmaktadır (Plaas ve diğ, 1999). Bu bulgular,

GalNAc kalıntılarının 4,6- O- disülfasyonunun, KS zincir sonlandırmasında indirgeyici olmayan uçta önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir.

KS biyosentezinin aksine, memelilerde KS zincirlerinin katabolizmasının altında yatan mekanizmalar iyi anlaşılmamıştır. KS bozulmasının ağırlıklı olarak lizozomlarda meydana geldiği düşünülmektedir (Prabhakar ve Sasisekharan, 2006). KS polisakkaritlerinin parçalanması, başlangıçta endo-tip hidrolazlar tarafından katalize edilir ve daha sonra ortaya çıkan oligosakkarit ürünleri, monosakkarit parçalarını serbest bırakmak için ekzolitik glikosidazlar ve sülfatazlar tarafından sırayla indirgeyici olmayan uçtan parçalanır (Prabhakar ve Sasisekharan, 2006).

KS çeşitliliği, genellikle, GalNAc'ın C-4 ve C-6'sındaki ve GlcA'nın C-2 ve C-3'ündeki OH gruplarının yerini alan sülfat gruplarıyla sağlanmaktadır. KS sınıflandırması ve tipi, sülfat grubu yerleşimine bağlıdır (Çizelge 1.3.) (Shi ve diğ, 2014; Malavaki ve diğ, 2008; Volpi, 2004). Zincir boyutunun ve sülfat deseninin elde edildikleri kaynağa göre değiştiği bilinmektedir. Mevcut veriler trakeal KS'nin KS-C (20–25 kDa) olduğunu göstermektedir. Köpekbalığından elde edilen KS'nin ise KS-D olup 50-80 kDa büyükte olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, herhangi bir KS zinciri, tek bir doku kaynağından bile olsa, boyuta göre heterojendir. Ayrıca, KS'nin bileşimi ve konsantrasyonu organizma ve dokuya bağlıdır, Bu nedenle karasal ve deniz kaynaklı KS, çeşitli zincir uzunlukları ve aşırı sülfatlanmış disakkaritler içermektedir. Örneğin köpek balığı KS-D, kalamar ve somon KS-E, timsah KS-E ve tavuk farklı oranlarda KS-A ve KS-E içermektedir (Schiraldi ve diğ, 2010; Malavaki ve diğ, 2008; Garnjanagoonchorn ve diğ, 2007).

**Çizelge 1.3:** Kondroitin sülfat çeşitleri ve sülfatlanma modelleri (Shi ve diğ, 2014)

| KS   |                     | KİMYASAL YAPI |   |
|------|---------------------|---------------|---|
| KS-O | Di-OS               | <p>O Unit</p> | -4)GlcA( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\beta$ 1-                           |
| KS-A | Di-A                | <p>A Unit</p> | -4)GlcA( $\beta$ 1-3)GalNAc <b>4S</b> ( $\beta$ 1-                |
| KS-B | Di-B                | <p>B Unit</p> | -4)GlcA <b>2S</b> ( $\beta$ 1-3)GalNAc <b>4S</b> ( $\beta$ 1-     |
| KS-C | Di-C                | <p>C Unit</p> | -4)GlcA( $\beta$ 1-3)GalNAc <b>6S</b> ( $\beta$ 1-                |
| KS-D | Di-diS <sub>D</sub> | <p>D Unit</p> | -4)GlcA <b>2S</b> ( $\beta$ 1-3)GalNAc <b>6S</b> ( $\beta$ 1-     |
| KS-E | Di-diS <sub>E</sub> | <p>E Unit</p> | -4)GlcA( $\beta$ 1-3)GalNAc <b>4S, 6S</b> ( $\beta$ 1-            |
|      | Di-triS             | <p>E Unit</p> | -4)GlcA <b>2S</b> ( $\beta$ 1-3)GalNAc <b>4S, 6S</b> ( $\beta$ 1- |

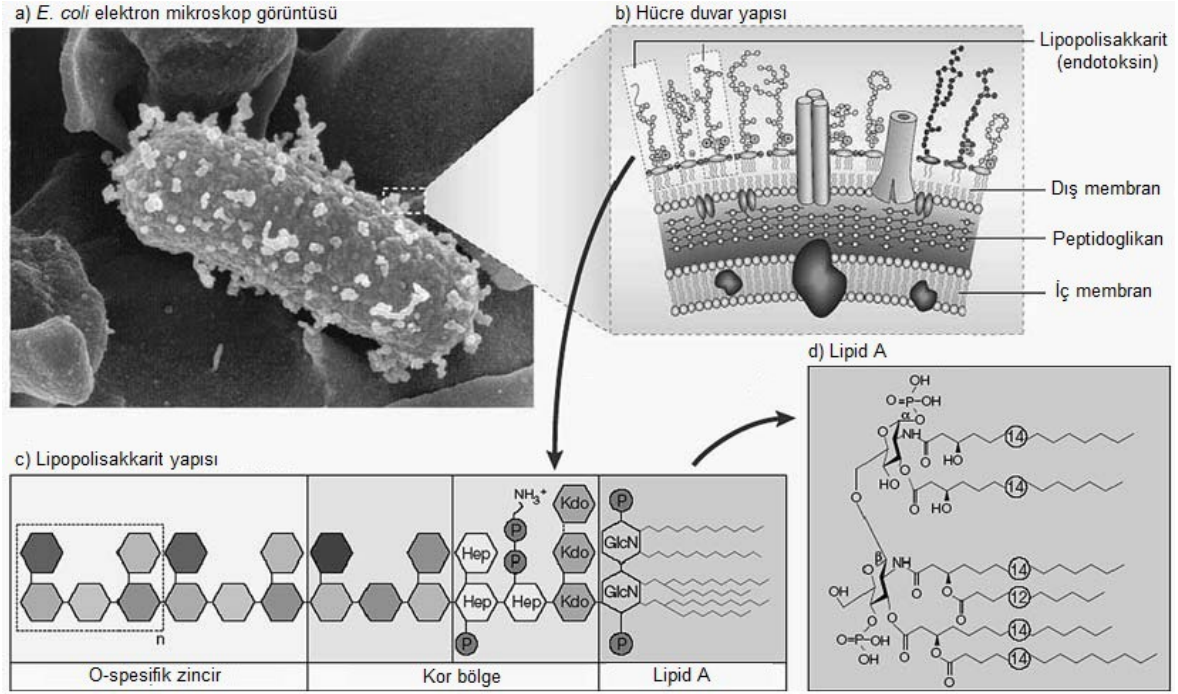
Çizelge 1.3. Devamı

| KS   | KİMYASAL YAPI |  |
|------|---------------|--|
| KS-E | Di-triS       | <p>-4)GlcA2S(<math>\beta</math>1-3)GalNAc4S, 6S(<math>\beta</math>1-</p>                     |
| KS-F |               | <p>-4)GlcA(<math>\alpha</math>1-3Fuc)(<math>\beta</math>1-3)GalNAc4S(<math>\beta</math>1</p> |
| KS-M |               | <p>-4)GlcA3S(<math>\beta</math>1-3)GalNAc4S, 6S(<math>\beta</math>1-</p>                     |
| KS-K |               | <p>-4)GlcA3S(<math>\beta</math>1-3)GalNAc4S(<math>\beta</math>1-</p>                         |
| KS-L |               | <p>-4)GlcA3S(<math>\beta</math>1-3)GalNAc6S(<math>\beta</math>1-</p>                         |
| KS-L | Di-tetraS     | <p>-4)GlcA2S, 3S(<math>\beta</math>1-3)GalNAc4S, 6S(<math>\beta</math>1-</p>                 |

#### 1.4 Mikroorganizmaların Hücre Yüzey Polisakkaritleri

Bazı bakteri ve mantarlar KS yada KS benzeri bileşikler üretebilmektedir. Mikrobiyal kapsüller polisakkaritlerin bu GAG'a yapısal benzerliği, bu bakterileri ideal KS kaynağı haline getirmektedir. KS yada KS benzeri bileşikler üretebilen mikroorganizmaların, insanlar ve hayvanlar için güvenli olması, avantajlı fermentasyon koşullarına sahip olması, genetik materyallerinin tanımlanmış olması ve çok sayıda KS veya analoglarını üretebilme yetenekleri bu mikroorganizmaları tercih edilir kılmıştır (Shi ve diğ, 2014; Jolly ve diğ, 2010).

Hücre yüzeyi polisakkaritleri, çeşitli bakteri türleri tarafından üretilen karmaşık karbonhidratlardır. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler, hücre zarına kovalent olarak bağlı ayrı bir kapsül veya hücre yüzeyine zayıf bir şekilde bağlı hücre dışı polisakkaritler üretirler. Hücre yüzeyindeki bu çeşitli polisakkaritler, genellikle bir konakçıda immünojenik bir tepki başlatan antijenik belirleyicileri içermekte ve bakteriyofajlar gibi patojenler için tanıma elemanları sağlamaktadırlar (Casale ve Crane, 2021). Hücre yüzey polisakkaritleri, hücre yüzeyine bağlanma tipine ve davranışlarına göre üç kategoride sınıflandırılmaktadır. Bunlar, lipopolisakkaritler (LPS), kapsüller polisakkaritler (KPS) ve ekzopolisakkaritlerin (EPS) parçası olan O antijenleridir (Şekil 1.3.). EPS'ler genellikle hücrenin etrafında amorf bir tabaka oluştururlar ve hücre yüzeyine kovalent olarak bağlı değildirler ve bu nedenle çevre ortama salınmaktadırlar. LPS'ler, Gram-negatif bakterilerin dış hücre zarındaki O antijenlerine güçlü bir şekilde bağlı bir oligosakkarit çekirdek ve bir lipid bileşenden (lipid-A) oluşmaktadır. KPS'ler, hücre zarında ya fosfolipidlere ya da lipid-A moleküllerine kovalent olarak bağlıdırlar. Ancak polisakkarit ile fosfolipid zar arasındaki fosfodiester bağının kararsızlığının bir sonucu olarak çevre ortama salınabilirler (Schiraldi ve diğ, 2010).



**Şekil 1.3:** *E. coli* bakterisinin a) Elektron mikroskop görüntüsü b) Hücre duvar yapısının, c) Lipopolisakkarit yapısının, ve d) Lipid A'nın şematik görüntüsü (Giuliani ve diğ, 2010)

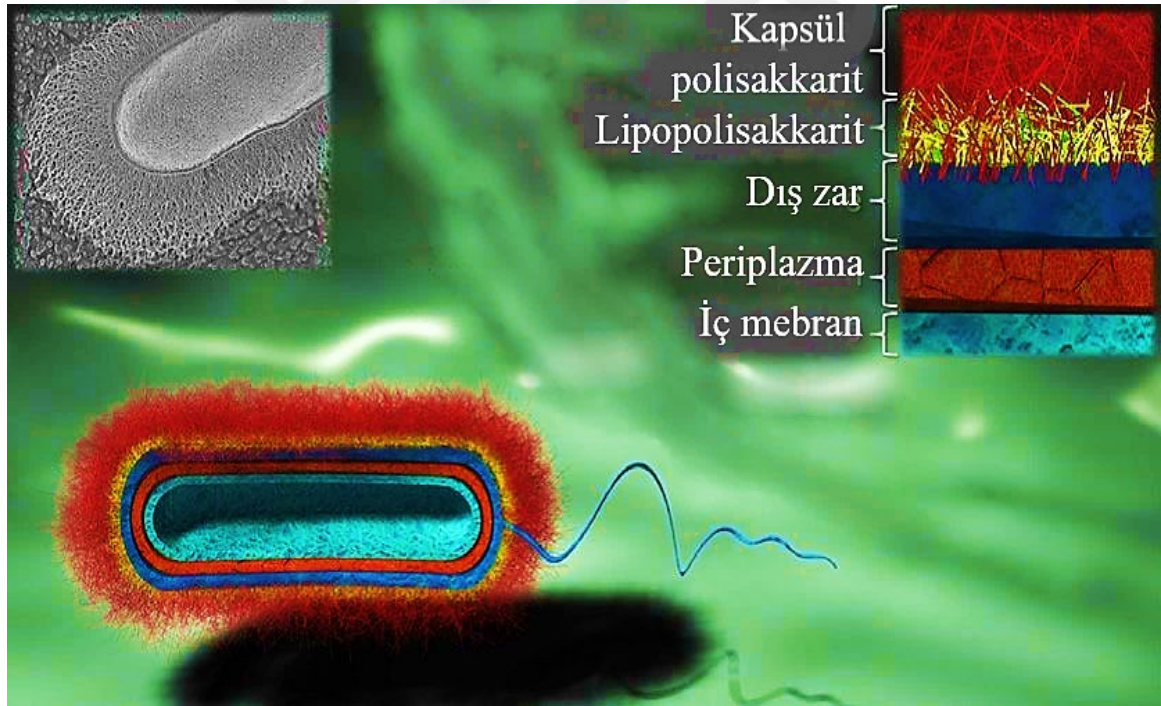
Tipik olarak, kapsül, çeşitli şekillerde ikame edilmiş bir anyonik polisakkaritten oluşmaktadır, ancak yüksüz polimerlerle birlikte proteinler de taşımaktadır. KPS, çevresel streslere direnç, yüzeylere yapışma ve patojenez dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. (Whitfield ve Roberts, 1999; Roberts, 1996). Birkaç patojenik bakterinin sahip olduğu KPS'nin, konakçıda hücre içi sağkalımı sağladığı ve enfeksiyonlarda önemli bir virülans faktörü olduğu belirlenmiştir (Mellata ve diğ, 2003). Kapsülün, bakterileri fagositlerin bakterisidal etkisine ve konakçı savunmalarına karşı koruduğu düşünülmektedir (DeAngelis ve Padgett-McCue, 2000). Ancak, *Streptococcus*, *Pasteurella* ve *Escherichia*'nın kapsül mutanlarının konakçı savunmalarına direnemediği kanıtlanmıştır (Chung ve diğ, 2001; Wessels ve diğ, 1994). Bu durumda kapsül, GAG benzeri polimerlerden oluşmaktadır. Bu koşullarda, kapsülün kimyasal yapısı konakçı GAG'lara çok benzer olduğundan antikor yanıtı çok sınırlı olmaktadır. Birkaç gram-pozitif ve gram-negatif bakteri patojenitelerini ve bulaşıcılıklarını artırmak için bu moleküler taklit stratejisini kullanmaktadırlar (Schiraldi ve diğ, 2010).

### 1.5 *E. coli* Kapsül Polisakkariti

Kapsül üreten *E. coli* suşları, kapsüllenmiş Gram-negatif bakterilerin modelleri olarak kabul edilmiş ve kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Kapsül antijenleri, oligosakkaridik

bileşim, dallanma ve yük yoğunluğu bakımından farklılık gösteren asidik polisakkaritlerdir (Şekil 1.4). Bu türün taşıdığı kapsüler polisakkaritler, yapısal özellikleri ve zenginlikleri açısından karakteristiktir. Bazı durumlarda kapsüllerin yapısı, konakçı tarafından ifade edilen yapılara benzer veya bunlarla ilişkilidir. Bu türe ait *E. coli* K4 ve K5 suşların kapsüler polisakkaritleri, sırasıyla sülfatlanmamış kondroitine ve heparine benzeyen polisakkaritleri ifade etmektedir. Bu kapsüller ayrıca çok zayıf immünojeniktir ve enfekte olmuş bireyler düşük bir antikor tepkisi göstermektedirler (Roberts, 1996; Sutherland, 1988).

Bir üropatojenik bir suş olan *E. coli* O5:K4:H4'nin, bakteri kapsülünden kapsüler K4 polisakkaritlerini (K4 KPS) ilk kez 1988 yılında Rodriguez ve arkadaşları izole ederek karakterize etmiştir. Bu suşun tekrarlayan disakkarit birimi GlcA ve GalNAc tarafından oluşturulan bir kapsüler polisakkarit ve sülfatlanmamış kondroitininkine benzer bir omurgaya sahip fruktozun  $\beta$ -bağlı terminal furanoz kalıntısını sentezlediği bildirilmiştir (Rodriguez ve diğ, 1988).



**Şekil 1.4:** Gram negatif bakterilerin hücre duvar yapısı (Willis ve Whitfield, 2013)

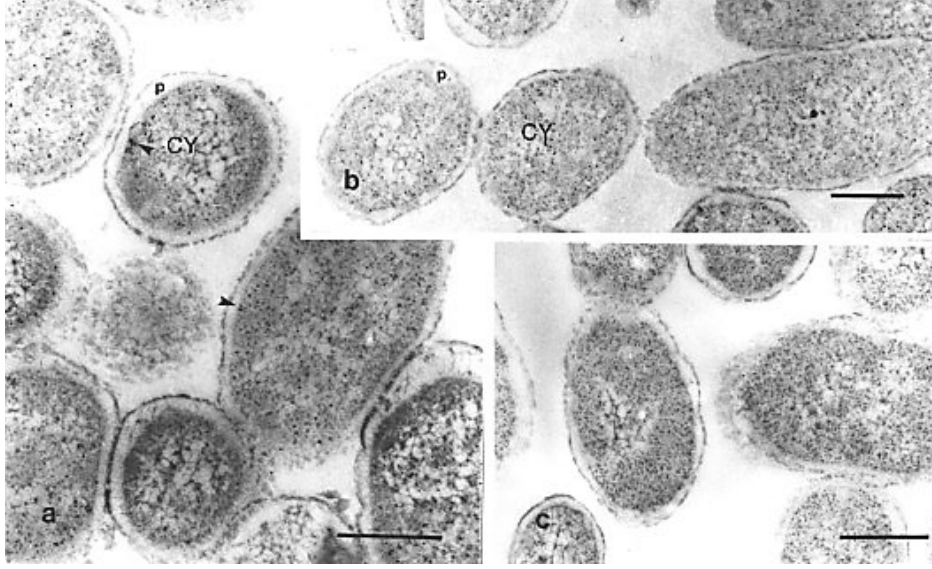
Kapsüllerin biyosentezi, polimerizasyonu ve taşınmasında yer alan proteinler, *kps* adı verilen genler tarafından kodlanmaktadır (Roberts ve diğ, 1988). *E. coli* suşlarının tüm *kps* kümeleri, üç bölgeden oluşan ortak bir organizasyonu paylaşmaktadır. Bunlardan 1. ve 3. bölge, *KpsM* ve *KpsT* gibi ABC taşıma sisteminin proteinlerini kodlayan genleri

içermektedir (Smith ve diğ., 1990). 2. bölge ise serotipe özgüdür ve polisakkaritin sentezinden sorumlu enzimleri kodlamaktadır. *E. coli* K4 suşunun 2. bölgesi 14 Kb uzunluğundadır ve 7 gen ( *kfoA*- *kfoG*) içermektedir. Bu 7 genden üçü olan *kfoA*, *kfoC* ve *kfoF* genleri sırasıyla kondroitin sentezinden sorumlu olan UDP-glukoz 4-epimeraz, kondroitin sentaz (kondroitin polimeraz) ve UDP-glukoz dehidrojenaz enzimlerini kodlamaktadır (Schiraldi ve diğ., 2010). *kfoC* geni, iki işlevli bir glikozil-transferaz olan bir kondroitin polimerazı kodlamaktadır. Kondroitin polimeraz, UDP-şekerlerini (hem GlcA hem de GalNAc kalıntıları) büyüyen polisakkarit zincirin indirgeyici olmayan ucuna aktararak çift etkili olarak çalışmaktadır (Ninomiya ve diğ., 2002).

Çalışmamızda kapsüler polisakkarit sentezinden sorumlu olan *kfoA*, *kfoC* ve *kfoF* genlerini taşıyan pETM6-PACF plazmidine, bakterilere ileri kültür koşullarında avantaj sağlayan *vgb* gen bölgesi entegre edilmiş ve *E. coli* (C2987) suşuna klonlanarak kondroitin üretimi sağlanmıştır. pETM6-PACF vektörü çok uzun bir vektördür (9865 bp), ve birçok parça klonlama sırasında homolog rekombinasyonlara neden olabilen T7 promotörü, lacI operatörü ve S-Tag gibi tekrarlayan bölgeler içermektedir (Erenler ve diğ., 2019).

## 1.6 *Vitreoscilla* Hemoglobin

Gram negatif bakteri olan *Vitreoscilla*'da 1986'da hemoglobin keşfedilmiştir (Wakabayashi ve diğ., 1986). Daha sonrasında diğer hemoglobinler ve flavohemoglobinler çeşitli mikroorganizmalarda bulunmuştur. Bununla birlikte, farklı mikrobiyal hemoglobin benzeri proteinler de rapor edilmiştir (Iijima ve diğ., 2000; Couture ve diğ., 1999; Andrews ve diğ., 1992). *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb), sitozoldeki çözünürlüğü ve amino asit dizilimi açısından %25 oranında ökaryotik hemoglobine benzemektedir (Khosla ve Bailey, 1988). Son zamanlarda, *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb), özellikle biyoteknolojik uygulamalarda, bakteriyel hemoglobinler arasında en çok çalışılan hemoglobin türüdür (Şekil 1.5.). Bu proteinin geni (*vgb*), özellikle *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* gibi gram negatif bakterilere, *Bacillus sp.* gibi gram-pozitif bakterilere, ve çeşitli mantar türlerine klonlanmıştır (Bülow ve diğ., 1999; Holmberg ve diğ., 1997; Dikshit ve Webster, 1988; Webster, 1987).



**Şekil 1.5:** *vgb* geni taşıyan *E. coli*'deki VHB'nin hücre içi lokalizasyonu. a) anti-VHB antikoru ile problemlenmiş yüksek havalandırma altında; b) bir anti-VHB antikoru ile problemlenmiş düşük havalandırma altında; c) bağışıklık öncesi serum ile problemlenmiş hücreler. Altın parçacıklar içinde lokalize olan VHB, özellikle a bölümünde ok ile gösterilmiştir. cy, sitoplazma; p, periplazma; bar uzunluğu: 0,5 um (Ramandeep ve diğ, 2001).

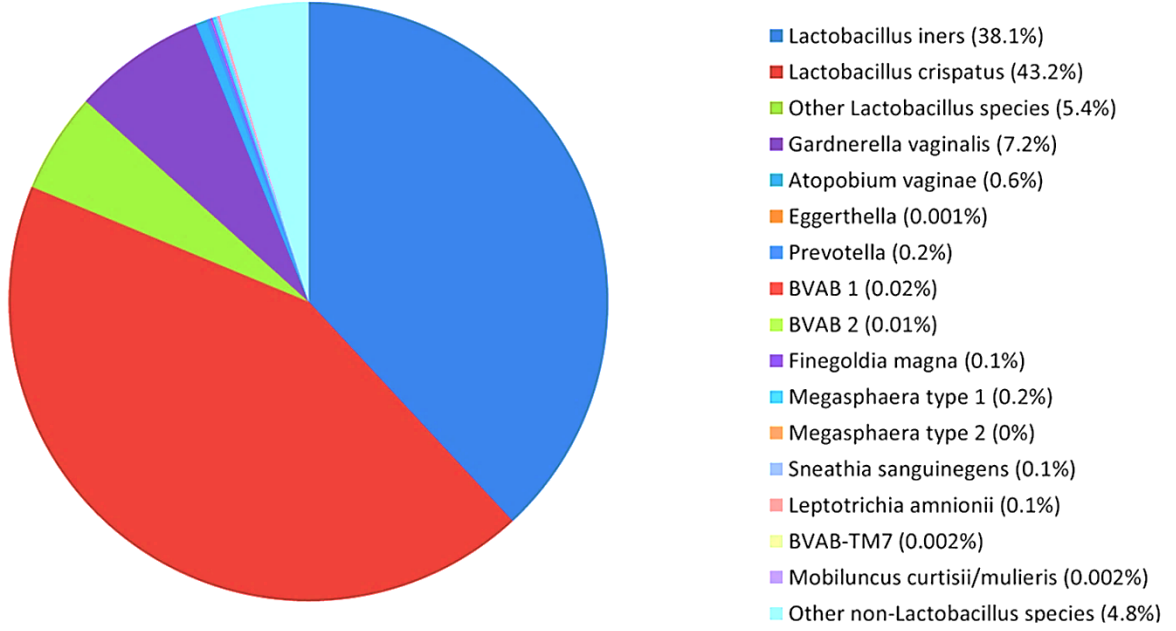
*Vitreoscilla*'daki VHB'nin hücre sel konsantrasyonunun, büyüme ortamının oksijen konsantrasyonu mikroaerobik seviyeye düştüğünde, ciddi miktarda arttığı görülmüştür (Boerman ve Webster, 1982). VHB'nin biyosentezi, hem doğal hem de rekombinant konakçısı *E. coli*'de hipoksik koşullar altında (hava doygunluğunun ~% 10'unun altında) aktif olan oksijene duyarlı bir promotör tarafından transkripte edilmektedir. Oksijenin sınırlı olduğu koşullar altında büyük bir hücre sel VHB konsantrasyonunun varlığı, VHB'nin birincil işlevinin moleküler oksijeni yakalamak ve *Vitreoscilla*'nın aerob bir organizma olmasına rağmen bu koşullar altında hayatta kalmasını sağlamak olduğunu göstermektedir (Ramandeep ve diğ, 2001). VHB'nin bir oksijen taşıyıcısı olan işlevi, solunum zarına yakınlığı, hücre sel işlevini en verimli şekilde yerine getirmesini sağlayacağını düşündürmektedir. *E. coli*'de bulunan VHB'nin yaklaşık % 40'ı periplazmik boşlukta bulunmaktadır. Dolayısıyla VHB çevresel oksijen kaynağına en yakın yere yerleşik olarak oksijen transferini kolaylaştırmaktadır (Khosla ve Bailey, 1989). VHB sentezi ile bakterilerin kontrol grubuna göre 10 kata kadar daha fazla oksijen alımına sahip olduğu ve hücrelerdeki oksidasyon düzeylerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla tüm bu veriler ışığında, VHB/*vgb*'nin sisteminin çalışmamızda Mikrobiyal KS üretimine destek olabileceği düşünülmüş *vgb* geni ile kondroitin sentezinden sorumlu *kfoA*, *kfoC* ve *kfoF* genlerinin birlikte eksprese edildiği orijinal bir rekombinant suş (*E. coli* pETM6-PACF - *vgb*) üretilmiştir (Erenler ve diğ, 2019; Erenler, 2019).

Tezimizde pek çok biyomedikal alanda etkinliği kanıtlanmış KS'nin oldukça sınırlı çalışılmış antifungal etkinliği araştırılmıştır. Antifungal enfeksiyonlar oldukça agresif ve yayılcı, tedaviye ise dirençli enfeksiyonlardır. Tedavi sürecinde kullanılan antimikrobiyal ajanlar kadar, vajenin histolojik yapısı ve vajinal mikroflora elemanlarında tanımlanması ve kontrolü önemlidir.

### 1.7 Vajinal Mikroflora Elemanları

Vajinal flora, vajinal epitel hücrelerinin glikojen içeriği, yaş, vajinal pH, vücut hormon seviyeleri, cinsel ilişki, doğum kontrol yöntemleri, antibiyotik tedavi süreci ve doğum gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Son yıllarda yeni nesil DNA dizileme yöntemleri kullanılarak, vajinal mikrofloranın, baskın *Lactobacillus* türlerinin yanında farklı 250'den fazla türden mikroorganizmaların da bulunduğu karmaşık bir yaşam alanı olduğu bildirilmiştir. Vajinal mikrobiyotada bulunan *Lactobacillus* türlerinden özellikle *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* ve *Lactobacillus jensenii* kadınların ~%75'inde bulunmaktadır. Kalan ~%25'inde ise çoğunlukla anaerobik bakterilerden oluşun türler bulunmakta ve baskın bir tür gözlenmemektedir (Ravel ve diğ, 2011).

Vajinal florayı oluşturan, *Actinomyces*, *Allisonella*, *Aerococcus*, *Alloscardovia*, *Anaerococcus*, *Arcanobacterium*, *Atopobium*, *Bacteroides*, *Balneimonas*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Blastococcus*, *Bulleidia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Coriobacteriaceae*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Facklamia*, *Faecalibacterium*, *Finegoldia*, *Gardnerella*, *Gemella*, *Haemophilus*, *Lachnospiraceae*, *Massilia*, *Megasphaera*, *Mobiluncus*, *Mollicutes*, *Moryella*, *Olsinella*, *Parvimonas*, *Peptostreptococcus*, *Peptinophilus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Providencia*, *Proteobacteria*, *Rhizobialis*, *Ruminococcaceae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Shuttleworthia*, *Sneathia*, *Solobacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Veillonella*, *Ureaplasma* cinsi mikroorganizmaların da varlığı tespit edilmiştir (Şekil 1.6.) (Shipitsyna ve diğ, 2013; Gajer ve diğ, 2012).

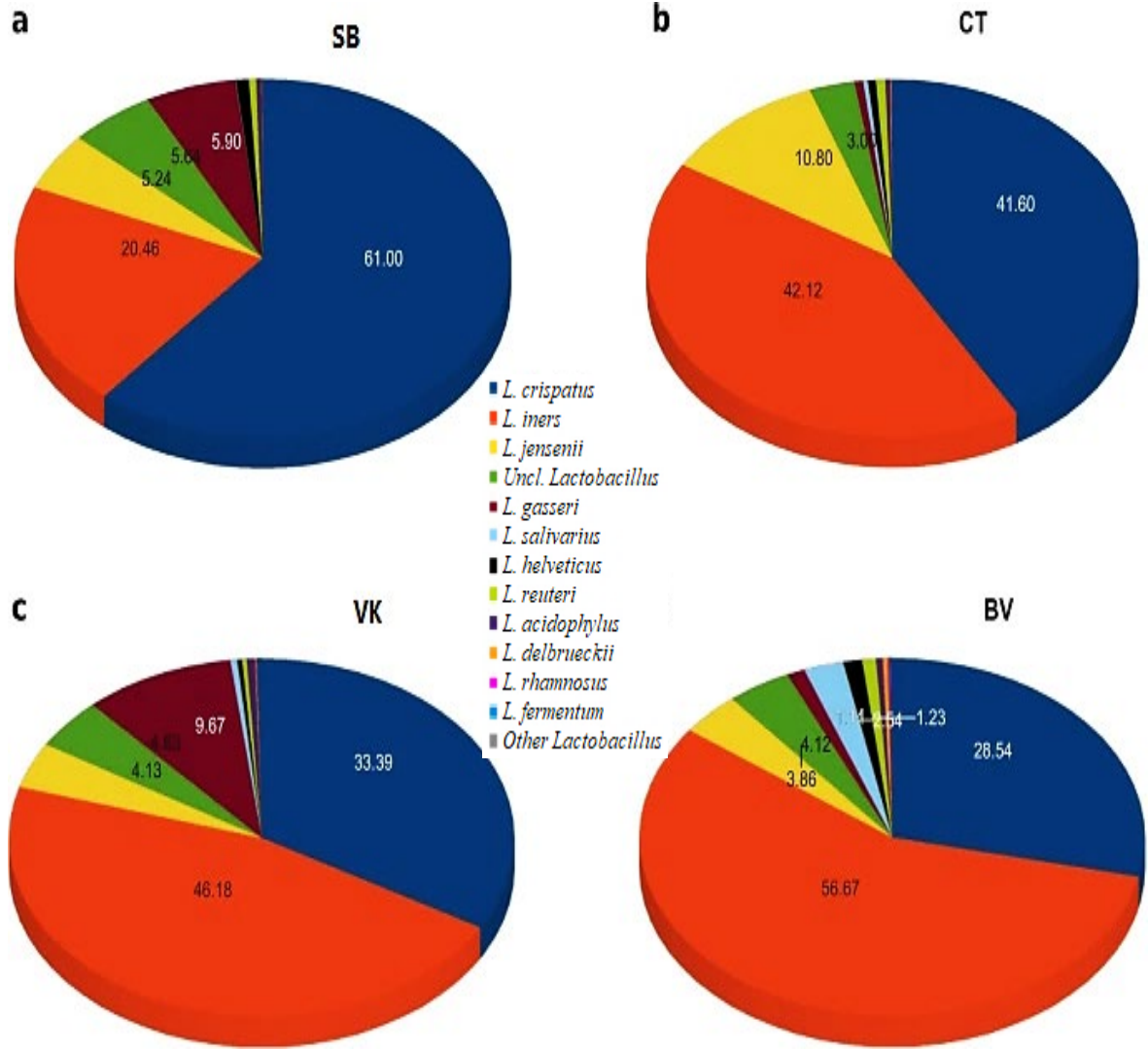


**Şekil 1.6:** Normal vajinal floraya sahip kadınlardaki vajinal mikrobiomun yüzde olarak dağılımı (Shipitsyna ve diğ, 2013)

Şekil 1.6.'de de görüldüğü gibi *Lactobacillus* türleri vajinal floranın en baskın bakterileridir ve aynı zamanda sağlıklı bir ürogenital sistemin korunmasında anahtar rol oynamaktadır (Eryılmaz ve diğ, 2018). Vajende laktik asit bakterilerinin önemini keşfeden ilk kişi Albert Döderlein'dir (Döderlein, 1892). Döderlein'in arkadaşı olan Krönig Laktobasilleri anaerobik kavisli çubuklar olarak tanımlamış, Curtis bu mikroorganizmaların kültürasyonunu gerçekleştirmiş, Spiegel ve Roberts ise *Mobiluncus curtisii* olarak adlandırmıştır (Krönig, 1895; Curtis, 1913; Spiegel ve Roberts, 1984). Sonrasında Stanley Thomas ilk kez *Lactobacillus acidophilus* terimini kullanmıştır (Thomas, 1928). Lauer, Johnson ve arkadaşları DNA- DNA hibridizasyon yöntemini kullanarak birkaç *Lactobacillus* türünü tanımlamışlardır (Lauer ve Kandler, 1980; Johnson ve diğ, 1980).

Yapılan bir diğer çalışmada, vajinal florayı oluşturan mikroorganizmalar arasında, *Lactobacillus* türlerinin, sağlıklı vajinal mikrobiotada bulunan bakterilerin en az %70'ini ( $10^7 - 10^8$  CFU (koloni oluşturan birim)/g vajinal sıvı) oluşturduğu tespit edilmiştir (Ravel ve diğ, 2011, Zhou 2004). Sağlıklı bir kadının vajinal florasında bulunabilecek *Lactobacillus* türlerini buldukları oranlar değişmekle beraber *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. iners*, *L. plantarum*, *L. minutus*, *L. brevis*, *L. cateniforme*, *L. leichmannii*, *L. salyarius*, *L. casei*, *L. vaginalis*, *L. delbrueckii*, *L.*

*rhamnosus* ve *L. reuteri* oluşturmaktadır (Şekil 1.7.) (Beamer ve diğ, 2017; Ventolini, 2015; Cribby ve diğ, 2008).



**Şekil 1.7:** Vajinal florada bulunan *Lactobacillus* cinsi mikroorganizmaların tür dağılımı. a) Sağlıklı birey (SB), b) *C. trachomatis* c) Vajinal Kandidiyazis (VK), d) Bakteriye Vajinazis (BV) (Ceccarani ve diğ, 2019)

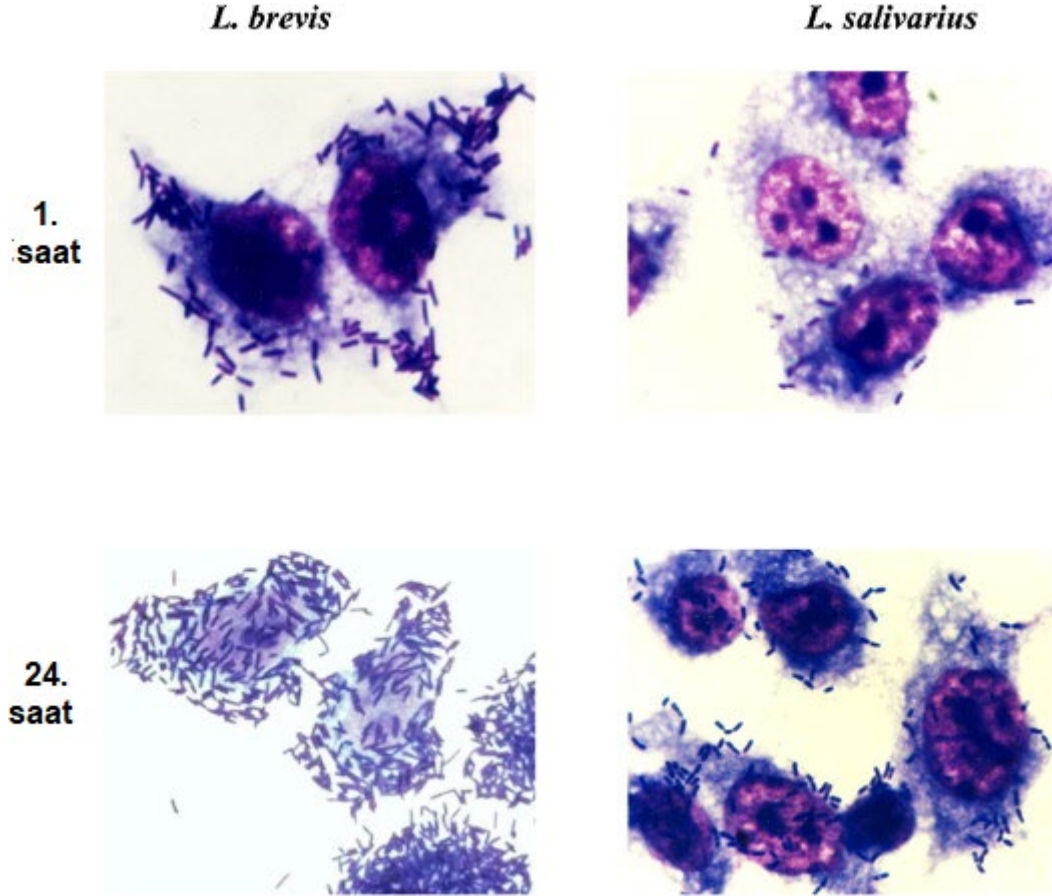
Menarştan önce vajinal flora elemanları bazı *Lactocillus* cinsi mikroorganizmalarla beraber cilt ve bağırsak mikroorganizmalarından oluşmaktadır (Vicariotto ve diğ, 2012). *Lactocillus* cinsi mikroorganizmalar için çevresel koşullar, kadınların üreme evresinin başlangıcından itibaren östrojenler ve progesteron hormonları tarafından düzenlenmektedir. Laktobasiller ve diğer bakteriler glikojeni glikoz ve maltoza ve ayrıca laktik aside metabolize etmektedirler. Bu metabolizma, normal olarak tanımlanan 3.8-4.4'lük bir vajinal pH'yı oluşturmaktadır (Mendling, 2016). Günümüze kadar 120'den fazla *Lactobacillus* cinsi bakteri türü identifikasyonu yapılmıştır. Rutin menstrüasyon evreleri başladıktan sonra, kadınların vajinal florasında ondan fazla farklı *Lactobacillus*

türüne rastlanabilmektedir. Ancak genellikle bir veya iki türün hakim olduğu floraya rastlanmaktadır (Beamer ve diğ, 2017; Ventolini, 2015; Cribby ve diğ, 2008; Larsen ve Monif, 2001).

*Lactobacillus* türleri, laktik asit bakterilerinin önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar. Mikroaerofilik veya anaerobik, spor oluşturmeyen, aside toleranslı, basil veya kok şekilli Gram pozitif bakterilerdir. Genellikle, değişen uzunluk ve büyüklükte (0,5-1,2 x 1-10 µm) olmakla birlikte, çiftler veya zincirler halinde bulunmaktadırlar. Aynı zamanda, katalaz negatif olmakla beraber bir kısmı yalancı katalaz üretebilmektedirler (Liu ve diğ, 2014). Optimum büyüme sıcaklıkları 30-40 °C ve pH'sı 5.5-6.2 aralığındadır. Laktobasillerin ana metabolizması, öncelikle laktik asit ve enerji üreterek farklı karbohidratların ve ilgili bileşiklerin parçalanmasıdır (Gülel, 2014). Glikoz fermentasyonlarına göre homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Homofermentatifler karbohidratlardan nihai ürün olarak laktik asit üretirken, heterofermentatifler laktik asit dışında etanol, asetik asit ve karbondioksit gibi ürünler de üretebilmektedir (Florou-Paneri ve diğ, 2013). *Lactobacillus* türleri tarafından üretilen metabolitlerden organik asitler, hidrojen peroksit, reuterin, antifungal peptitler ve bakteriyosinler antimikrobiyal etkinliğe sahip bileşiklerdir (Aldunate ve diğ, 2015; Dobson ve diğ, 2012; Holzapfel ve diğ, 1995).

Kadın ürogenital sisteminin sağlığı ve işleyişi buradaki mikrofloraya bağlıdır (Larsen ve Monif, 2001). İnsanda normal vajinal flora, bakteriyel vajinozis, idrar yolu enfeksiyonları, maya enfeksiyonları ve cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar gibi bir dizi ürogenital hastalığın önlenmesinde kilit rol oynamaktadır (Cherpes ve diğ, 2003; Wiesenfeld ve diğ, 2003; Pybus ve Onderdonk, 1999; Martin ve diğ, 1999; Gupta ve diğ, 1998). Bu koruyuculuk temelde sağlıklı kadınların vajinal floralarında baskın olan *Lactobacillus* türlerine atfedilmektedir. *Lactobacillus* türü mikroorganizmalar, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla önemli koruyucu roller oynamaktadırlar (Ravel ve diğ, 2011). Bunların arasında, laktik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosinler ve biyosümfaktanlar gibi çeşitli antimikrobiyal bileşiklerin üretimi, rekabetçi dışlama, birlikte agregasyon, immünomodülasyon ve bakteriler arasındaki sinyalleşme bulunmaktadır (Reid ve diğ, 2011; Kaewsrichan ve diğ, 2006). Yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus* türlerinin vajinal epitel hücrelerini tüm yüzeyi boyunca kaplayarak yapışması, patojen mikroorganizmaların adsorpsiyonunu fiziksel olarak engellediğini göstermiştir. Bu çalışmada, yüksek sayıda *Lactobacillus* türü hela hücrelerine yapışarak dolayısıyla hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak *Chlamydia*

*trachomatis*'in bağlanmasını engellemektedir. Yapılan başka bir *in vitro* çalışmada, vajinal florada bulunan *Lactobacillus* türlerinin konsantrasyonlarına bağlı olarak, *C. trachomatis* üzerinde inhibisyon etkisinin bulunduğu kanıtlanmıştır (Nardini ve diğ., 2016). *Lactobacillus* türlerinin hela hücrelerine yapışma derecesi, türler arasında değişiklik göstermektedir (Şekil 1.8.) (Mastromarino ve diğ., 2014).



**Şekil 1.8:** *Lactobacillus* türlerinin 1. ve 24. saatteki Hela hücreleri yüzeyine yapışması gösteren Gram boyama örneği (Mastromarino ve diğ., 2014)

### 1.7.1 *Lactobacillus acidophilus*

*L. acidophilus* en yaygın bilinen ve kullanılan probiyotik bir bakteridir (Ouwehand ve diğ., 2014; Homayouni ve diğ., 2014; Vicariotto ve diğ., 2012). Hastalığa neden olan patojen mikroorganizmalara karşı korudukları vajen ve bağırsaklarda yaşamaktadırlar. *L. acidophilus* 0,6-0,9 x 1,5-6 µm boyutlarında, çiftler ve kısa zincirler halinde, çubuk şeklinde bir mikroorganizmadır. Taşıdıkları DNA'larının G+C oranı % 32-37'dir ve zorunlu homofermentatiftir. Mikroaerofilik olduğu için aerobik ortamda da üreyebilmekte, ancak %5 karbondioksit (CO<sub>2</sub>), %10 su (H<sub>2</sub>O) ve %85 azot (N) içeren anaerobik koşullarda daha iyi üremektedir (Robinson ve Itsaranuwat, 2005). *L. acidophilus*, laktosin B, laktasin

F, asidosin A ve asidosin B gibi bakteriyosinleri üretmektedir. *Lactobacillus* cinsinin birçok suşunun insanlarda terapötik faydaların yanı sıra profilaktik faydalar sağladığı gösterilmiştir (Gopal, 2011).

1980 yılında, daha önce *L. acidophilus* olarak tanımlanan mikroorganizmaların oldukça heterojen olduğu rapor edilmiştir (Lauer ve diğ, 1980; Johnson ve diğ, 1980). *L. acidophilus* suşlarının fizyolojik özellikleri, hücre duvarının şeker deseni, üretilen laktik asit tipi, taşıdıkları DNA'ların G+C içeriği ve DNA homoloji değerleri açısından farklı olduklarını keşfetmişlerdir. Ve bu grup içerisindeki *Lactobacillus* cinsi mikroorganizmaları *L. acidophilus*, *Lactobacillus amilovor*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri* ve *Lactobacillus johnsonii* olarak yeniden adlandırmışlardır (Lauer ve diğ, 1980; Johnson ve diğ, 1980).

*L. acidophilus* grubu türler birbirine çok benzer türler olduklarından basit fizyolojik ve biyokimyasal testler ile ayırt edilmesi mümkün değildir. Dolayısıyla bu testler yakın akraba oldukları için *L. acidophilus* grubu türleri yanlış kimliklendirmektedir. Bu türlerin kesin olarak tanımlanabilmesi için genotipik tanımlama yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Birden fazla moleküler karakterizasyon yöntemi uygulanarak ve sonuçları birleştirilerek kesin tanımlama sağlanmıştır. *L. acidophilus* suşlarının hücre proteinleri SDS-PAGE, RAPD-PCR yöntemleri kullanılarak ayırt edilmesi sağlanmıştır (Klein ve diğ, 1998; Du Plessis ve diğ, 1995; Pot ve diğ, 1993). Bunun yanı sıra, PCR ve DNA dizileme yöntemleri kullanılarak kimliklendirme çalışmaları yapılmıştır. (Nour, 1998; Tilsala-Timisjarvi ve Alatossava 1997; Schleifer ve Ludwig, 1995; Hertel ve diğ, 1993; Hensiek ve diğ, 1992; Collins ve diğ, 1991).

### **1.7.2 *Lactobacillus. crispatus***

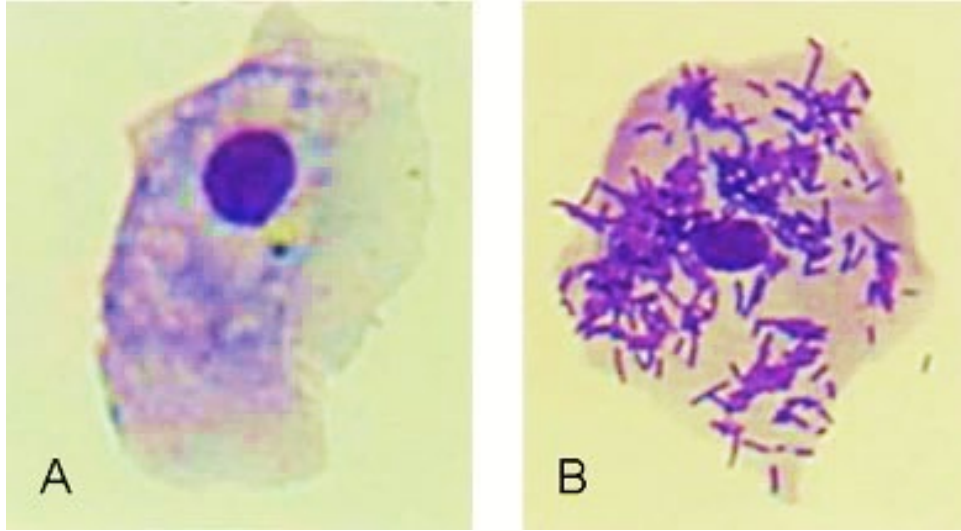
*L. crispatus*, 0,8-1,6 x 2,3-11 µm boyutlarında, düz ila hafif kavisli çubuk şeklinde bir mikroorganizmadır ve kısa zincirler halinde bulunmaktadır. Zorunlu homofermentatifler ve DNA'sının G+C oranı % 35-38'dir. Vajinal florada bulunmasının yanı sıra insan dışkısından ve bukkal boşluklardan izole edilebilmektedirler.

*L. crispatus* yapılan çalışmalarda vajinal florada Laktobasiller arasından en baskın türlerden biri olarak görülmektedir (Beamer ve diğ, 2017; Ventolini, 2015; Cribby ve diğ, 2008; Larsen ve Monif, 2001). *L. crispatus*'ın bu baskınlığının başlıca sebepleri van der Veer ve arkadaşları tarafından 4 maddede sıralanmıştır (van der Veer ve diğ, 2019).

- Vajinal mukoza yüzeyinde hücre dışı matriks (biyofilm) oluşturma yetenekleri

- Laktik asit, bakteriyosinler gibi antimikrobiyallerin üretimi ve ürogenital patojenlerin büyümesini ve/veya yapışmasını engelleyen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretebilmeleri
- Vajinal lümendeki ana karbon kaynağı olan glikojen gibi mevcut besinlerin verimli kullanımı
- Konakçının modülasyonu -immünojenik tepkiler

*L.cripatus*, normal vajinal mikrobiyotanın stabilitesini ve antibiyotik tedavisini takiben bu mikrobiyotanın yeniden vajinal floraya hakim olmasını desteklemekte ve dolayısıyla vajenin bakteriyel vajinozdan korunmasında rol oynamaktadır (Petrova ve diğ, 2015; Verstraelen ve diğ, 2009; Cruciani ve diğ, 2015). *L. cripatus* suşlarının in vitro olarak üropatojenlerin büyümesini ve vajinal epitel hücrelerine yapışmalarını engellediği rapor edilmiştir (Şekil 1.9.) (Kwok ve diğ, 2006; Osset ve diğ, 2001). *L. cripatus*'un ayrıca *Neisseria gonorrhoeae* ve *C. trachomatis*'in HeLa hücrelerine yapışmasını azalttığı gösterilmiştir (Mastromarino ve diğ, 2014; Vielfort ve diğ, 2008).



**Şekil 1.9:** *L. crispatus* 1.(A) ve 24.(B) saatteki vajinal epitel hücreleri yüzeyine yapışmasını gösteren Gram boyama örneği (Kwok ve diğ, 2006)

### 1.7.3 *Lactobacillus jensenii*

*Lactobacillus jensenii*, vajen mikrobiyotasına hakim olan *Lactobacillus* türlerinden en yaygın bulunan türlerden biridir (Beamer ve diğ, 2017; Cribby ve diğ, 2008). Vajinal mikrobiyotanın yanı sıra mesane mikrobiyotasında da bulunmaktadır (Thomas-White ve diğ, 2018). *L. jensenii*'nin, vajen ve kadın mesanesindeki üropatojen *E. coli*'nin de dahil olduğu patojen bakterilerin kolonizasyonunu önleyen bakterisidal bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Kalyoussef ve diğ, 2012). *L. jensenii*'nin mesaneden sadece iki suş

karakterize edilmişken Putonti ve arkadaşları kadınlardan alınan idrar örneklerinden 11 yeni *L. jensenii* suşu tanımlamışlardır( Thomas-White ve diğ, 2018; Putonti ve diğ, 2019).

*L. jensenii* anaerobik olarak glikojeni metabolize etmektedir. Gebelikte artan östrojen seviyesi *L. jensenii* metabolizmasına etki ederek glikojen artışına neden olmaktadır. Bu da asidik vajinal ortama katkıda bulunmaktadır. Bu asidik ortamın, erken doğuma neden olabilen enfeksiyonları önlemek için doğal bir mekanizma olduğu ve bakteriyel vajinoza neden olan bakterilerin üremesini baskıladığı belirtilmiştir (O'Hanlon ve diğ, 2011). *L. jensenii* karaciğerden aynı zamanda üst gastrointestinal sistemdeki gıdaların sindirimine yardımcı olan hidrolaz salgılamasına neden olan enzimler ürettiği düşünülmektedir. *L. jensenii* ayrıca Lactacin F üreterek bu protein sayesinde diğer *Lactobacillus* ve *Enterococcus* bakterilerinin popülasyonunu azaltmaktadır. *L. jensenii* aynı zamanda fermente gıdaların üretiminde kullanılmaktadır. *L. jensenii*, anne sütünün sindirimini iyileştirmek için yenidoğanların tedavisinde kullanılabilir (Prince ve diğ, 2014).

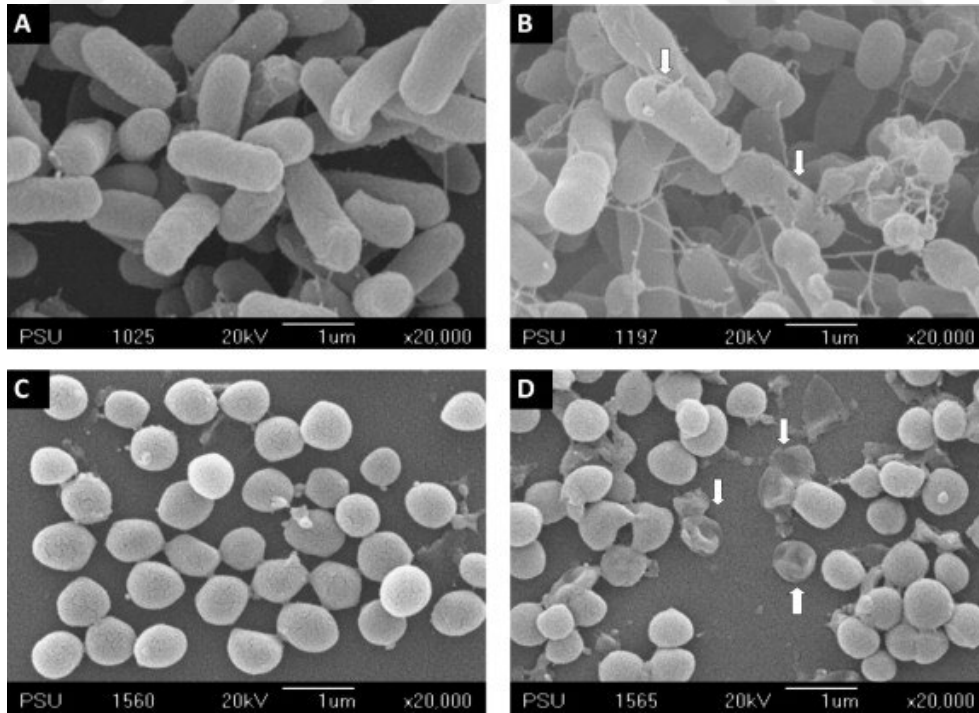
#### **1.7.4 *Lactobacillus gasseri***

*L. gasseri*, vajinal mikrobiyomu oluşturan *Lactobacillus* türlerinin yine en yaygın bulunanlarından biridir. *L. gasseri*, 0,6-0,8 x 3,0-5,0 µm boyutlarında, kısa zincirler halinde bulunan çubuk şekilli bir mikroorganizmadır. Zorunlu heterofermentatifler. Arginini hidrolize etmemektedirler ve DNA'larının G+C oranı % 33-35'tir. Vajinal florada ve ağız florasında bulunmaktadır (Gülel, 2014). Kadınların yaklaşık %75'inde bulunduğu düşünülen en baskın *Lactobacillus* türlerinden, *L. gasseri*'nin zaman içinde en istikrarlı topluluk olduğu ve nadiren diğer türlere geçiş yaptığı düşünülmektedir (Gajer ve diğ, 2012; Boris ve Barbés, 2000). Dolayısıyla taşıdığı bu istikrar sebebiyle konağı patojenlere karşı koruma mekanizmasının aydınlatılmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

Epitel hücreleri öldüğünde ve döküldüğünde salınan, vajinal epitel hücrelerinin yüzeysel ve ara tabakalarında depolanan ana karbonhidrat glikojendir. Konakçıdan  $\alpha$ -amilaz salgılanmasıyla, vajinal mikroflorayı oluşturan *L. gasseri* muhtemelen bir karbon kaynağı olarak glikojeni kullanabilmektedir (Anderson ve diğ, 2014; Spear ve diğ, 2014). Yapılan çalışmalarda *L. gasseri*'nin *Trichomonas vaginalis*'in insan vajinal hücrelerine yapışmasını önemli ölçüde engellediği bulunmuştur (Phukan ve diğ, 2018). *L. gasseri*'nin aynı zamanda biyofilm oluşumuyla ilgili genlerin ekspresyonunu azaltarak, *Candida albicans*'in kolonizasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur (Matsuda ve diğ, 2018).

### 1.7.5 *Lactobacillus fermentum*

*L. fermentum* en çok probiyotik özelliğiyle bilinmektedir. *L. fermentum* vajende ve bağırsakta baskın bir mikroflora elemanıdır. Dolayısıyla, bağırsak ve vajende probiyotik olarak kullanılabilir. *L. fermentum*, çoğu *Lactobacillus* türü gibi laktik asit, kısa zincirli yağ asitleri, bakteriyosin, biyosümfaktanlar ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gibi inhibitör bileşikler üreterek bağırsaktaki ve vajendeki patojenik enfeksiyonları engelleyebilmektedirler. (Kaur ve diğ, 2013; Anukam ve Reid, 2007; Boris ve Barbés, 2000). *L. fermentum*, patojen mikroorganizmalarla besin için rekabet içerisine girmek, bağırsak ve vajinal epitel hücre yüzeylerine yapışarak patojenlerin bu yüzeylere yapışmasını engellemek ve bağışıklık sistemini uyararak yoluyla antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Stöber ve diğ, 2010; Lebeer ve diğ, 2008; Reid ve Burton, 2002). Yapılan bir klinik çalışma, *L. fermentum* sağlıklı insanlarda bağırsak patojenlerini azaltmış ve probiyotik mikroorganizma miktarını artırmıştır (Shieh ve diğ, 2011). Probiyotik mikroorganizmaların oral olarak kullanımı, vajinal mikrobiyotanın normalleşmesini sağlamıştır (Vitali ve diğ, 2012). Yapılan başka bir çalışmada, *L. fermentum* suşunun *E. coli* ve *Gardnerella vaginalis* ile aynı ortamda tutulması sonucu *L. fermentum* 'un bu türler üzerine inhibe edici etkisi gözlenmiştir (Şekil 1.10) (Kaewnopparat ve diğ, 2013).



**Şekil 1.10:** (A) *E. coli* ve (C) *G. vaginalis*'in *L. fermentum* suşu ile muamele edildikten sonra ok ile gösterilen yerlerdeki hasar görmüş (B) *E. coli* ve (D) *G. vaginalis*'in Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri (Kaewnopparat ve diğ, 2013).

*L. fermentum* insanda immünolojik yanıtı arttırdığı ve ayrıca toplumsal kaynaklı gastrointestinal ve üst solunum yolu enfeksiyonlarını önlediği düşünülmektedir. *L. fermentum* gıda koruyucu madde olarak kullanılabilmekte ve antibiyotiklere alternatif olarak uygulanabilen çeşitli ve güçlü antimikrobiyal peptitler üretmektedir. Ayrıca, bu mikroorganizma kan dolaşımı kolesterol seviyesini düşürebilmekte ve insanlar arasında karaciğer hastalığı ve kolorektal kanseri önlemeye yardımcı olabilmektedir (Naghmouchi ve diğ, 2020). Son olarak, *L. fermentum* hamur teknolojisinde aroma, doku veya sağlığı destekleyen hamur bileşenlerine katkıda bulunan önemli bir mikroorganizmadır. Tüm bu gıda teknolojisiyle ilgili kullanılabilirliği yeni gıda maddeleri geliştirmek ve yem ve gıdada antibiyotik kullanımını sınırlamak için kullanılmıştır (Naghmouchi ve diğ, 2020).

### **1.7.6 *Lactobacillus iners***

*L. iners* de yukarıda bahsedilen diğer Laktobasiller gibi normal vajinal floranın önemli bir parçası olan *Lactobacillus* türüdür (Jakobsson ve Forsum, 2007). *L. iners*'in identifikasyonu ve vajinal flora içerisindeki biyolojik aktivasyonu ile ilgili özellikle son birkaç yılda yapılan çalışmalar yoğunluktadır. *L. iners*'in bakteriyel vajinosiz gibi vajinal disbiyoz durumunda da varlığı saptandığından vajinal sağlıktaki rolü belirgin değildir. *L. iners*, simbiyotik veya parazitik bir yaşam tarzının göstergesi olan yaklaşık 1 Mbp olan küçük bir genoma sahiptir (Petrova ve diğ, 2017).

*L. iners*'in konak mikrobiyotası için faydalı yada zararlı olduğu konusunda pek çok tartışma vardır. Yapılan bir çalışmada *L. crispatus*'un egemen olduğu vajinal mikrobiyotaya, menstrüasyon sırasında *L. iners*'in egemen olduğu bildirilmiştir (Gajer ve diğ, 2012). Dolayısıyla burada *L. iners*'in, vajinal mikrobiyotanın iyileşmesine katkıda bulunan bir tür olduğu bildirilmiştir (Srinivasan ve diğ, 2010). Ayrıca, *L. iners*'in baskın olduğu vajinal mikrobiyotaya sahip gebe kadınların çoğu olumsuz gebelik sonucu olmadan vaktinde doğum yaptıkları rapor edilmiştir (Kindinger ve diğ, 2017, Petricevic ve diğ, 2014)

## **1.8 Vajinal Savunma Mekanizmaları**

### **1.8.1 Laktik asit üretiminin önemi (vajinal pH)**

Sağlıklı üreme çağındaki kadınlarda, vajinal mikrobiyom, genellikle, *Lactobacillus* cinsinin baskınlığını gösterir (Ravel ve diğ, 2011). Vajinal mikrobiyotayı oluşturan *Lactobacillus* türlerinin baskın olduğu duruma Vajinal öbiyoz denmekle beraber, bakteriyel vajinoz gibi çoklu anaerobların aşırı büyümesi ile karakterize olan duruma ise

vajinal disbiyoz denmektedir. Laktik asitlerin antimikrobiyal etkileri, dissosiyeye olmamış yapıya sahip olmaları ve pH'yı düşürme özellikleri ile sağlanmaktadır (Erkmen ve Bozoğlu, 2008a, 2008b). Doğal olarak yada probiyotik olarak vajende bulunan *Lactobacillus* türleri laktik asit üreterek vajinal pH'yı düşürür ve ortamın asitliğini arttırmaktadır. Dolayısıyla vajinal disbiyoz durumunda, patojen mikroorganizmaları öldürerek öbiyoz oluşturmaktadır (Tachedjian ve diğ, 2017). *L. crispatus* tarafından elde edilen asitlik, *L. iners*, *L. jensenii* ve *L. gasseri* ile karşılaştırıldığında en yüksektir (Ravel ve diğ, 2011). Vajinal disbiyoz durumunda vajende orta düzey Laktobasil yükü (orta mikrobiyota) ya da Laktobasil içermeyen (bakteriyel vajinoz, BV) polimikrobiyal popülasyonların varlığı gözlenmektedir (Ravel ve diğ, 2011; Ling ve diğ, 2010; Nugent ve diğ, 1991).

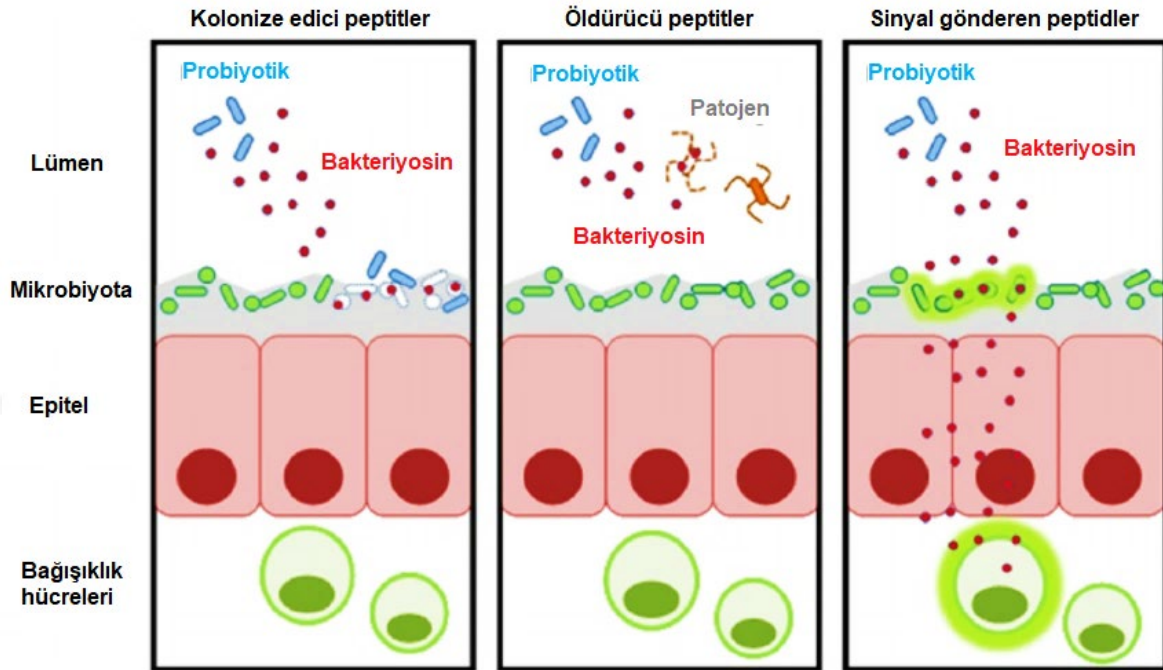
Laktobasillerin varlığıyla doğru orantılı olan laktik asit üretimi, vajinal mikrofloranın faydalı aktivitesi olarak kabul edilir. Laktik asitin varlığı ve konsantrasyonu, sırasıyla patojen mikroorganizmaların dışlanmasını sağlamakta ve vajinal sağlığın önemli bir biyolojik belirteci olarak görülmektedir. Vajinal pH'nın düşmesi patojen mikroorganizmaların fazla enerji harcamasına, protein denatürasyonuna, canlılık kaybına ve DNA'larının bozulmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla pH düşüşü hücre sel bileşenleri, yapıları ve hücre içi fonksiyonları etkilemektedir. Vajinal pH, genital enfeksiyonların teşhisi için yaygın olarak kullanılmaktadır ve dolayısıyla vajinal sağlığın başka bir göstergesidir. Vajinal pH, bakteriyel vajinosiz ve trikomonas vajiniti hastalıklarında yüksek miktarda artarken vajinal kandidiyazis durumunda azalmaktadır (Nenadic ve Pavlovic 2015; Ryu ve Min 2006). Bazı çalışmalarda Laktik asitin, *C. trachomatis* ve HIV-1 gibi çok çeşitli üreme yolu patojenlerini etkisiz hale getirebildiği bildirilmektedir (Gong, 2014; Aldunate ve diğ, 2013).

### **1.8.2 Bakteriyosinler**

Vajinal floraya hakim *Lactobacillus* türlerinin vajinal epitel yüzeyi kontrol edebilen antimikrobiyal metabolitler üretebildiği bilinmektedir. Bakteriyosinler, diğer bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip, biyoaktif bakteriyel peptitler veya proteinler grubu antimikrobiyal metabolitlerdir (Gaspar ve diğ, 2018). Yakından ilişkili türlere (dar spektrum) veya cinslere (geniş spektrum) karşı bakterisidal veya bakteriyostatik aktiviteye sahip moleküllerdir (Cotter ve diğ, 2005; Klaenhammer, 1993). Bakteriyosinler, hücre duvarı biosentezini inhibe ederek ve/veya gözenek oluşumu yoluyla zarın yapısı bozarak

hücre ölümüne yol açmaktadır (Mills ve diğ, 2011). Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler tarafından üretilmektedirler. Özellikle laktik asit bakterileri, ribozomlarda bu antimikrobiyal peptitleri ve proteinleri üretmektedirler (Muriana ve Klaenhammer, 1991).

Bakteriosin terimi, ilgili bakteriler üzerinde antimikrobiyal olarak aktif olan ancak üretici hücreye zarar vermeyen toksik bir protein veya peptid olarak tanımlanmıştır. Bakteriyosinler üretildikleri mikroorganizma türüne göre adlandırılmaktadır. Örneğin, *E. coli* tarafından üretilen, ilk tanımlanan bakteriyosine kolisin adı verilmiştir. Öncesinde *Pseudomonas pyocyanea* olarak tanımlanan şimdi *P. aeruginosa* olarak bilinen bakteriden üretilen bakteriyosine piyosin, *Enterobacter cloacae*'den üretilen bakteriosine kloasin, *Klebsiella*'dan üretilen bakteriosine klebisin, *Lactococcus*'tan üretilen bakteriosinlere laktokokin, *Staphylococcus*'tan üretilen bakteriosinlere stafilokoksin denmektedir (Karpiński ve Szkaradkiewicz, 2016; Lagos, 2013). Bakteriyosinler Şekil 1.11.'de gösterildiği gibi 3 mekanizma yoluyla sağlıklı vajinanın florasının stabilizasyonunu sağlamaktadır. Bakteriyosinler, bir probiyotığın yerleşik mikrobiyota ile rekabetini kolaylaştırarak kolonize edici peptitler olarak hareket edebilmektedir. Patojenleri doğrudan ortadan kaldırarak öldürme işlevi görebilirler. Aynı zamanda bağışıklık sistemine sinyal gönderen peptitler olarak hizmet edebilirler (Dobson ve diğ, 2012).



Şekil 1.11: Bakteriyosinlerin vajinal floraya katkıda bulunduğu mekanizmanın grafiksel çizimi (Dobson ve diğ, 2012).

Bakteriyosinler sahip oldukları antimikrobiyal aktivitelerden dolayı, tıpta, eczacılıkta, patojenik çoklu ilaca dirençli suşların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. En büyük ve şimdiye kadar en iyi tanınan bakteriyosin grubunu laktik asit bakterileri üretilen bakteriyosinlerdir. 40'tan fazla ülkede, süt ürünleri, peynirler, et, balıklar, salatalar ve konserve gibi yiyeceklerde gıda koruyucu maddesi olarak kullanılmaktadır (Karpiński ve Szkaradkiewicz, 2016).

### 1.8.3 Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), çoğunlukla *Lactobacillus* türleri tarafından farklı derecelerde üretilir ve vajinal sağlığın önemli bir göstergesidir. Dolayısıyla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> genital sistem patojenlerine karşı koruma sağlayan önemli bir antimikrobiyal bileşiktir ve çoğu zaman patojenlerin girişini önleyen birincil mekanizmadır. (Zheng ve diğ, 2019; Aldunate ve diğ, 2015; O'Hanlon ve diğ, 2013). Çoğu *Lactobacillus* türü oksijen varlığında sahip oldukları flavoprotein oksidaz enzimi ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretmektedir (Yang, 2000; Erkmen ve Bozoğlu, 2008b). Bununla birlikte *Lactobacillus* türleri nikotinamid adenin hidroksi dinükleotid (NADH) peroksidaz enzimleri ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretmektedirler (Yang, 2000). *Lactobacillus* türleri katalaz enzimine sahip olmadıkları için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ortamda birikmektedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, patojen mikroorganizmanın glikoz taşıma sistemini, heksokinaz aktivitesini ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enzimlerini inhibe etmektedir (Akpınar ve Kılıç, 2012). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bakteri, maya, küf ve virüsler üzerinde etkilidir (Erkmen ve Bozoğlu, 2008b). Yapılan çalışmalarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin *C. albicans*'a karşı inhibitör etkisini rapor edilmiştir (Larsen ve White, 1995; Lenander-Lumikari, 1992).

### 1.9 Vajinal Enfeksiyon Çeşitleri

1970'lerden önce kullanılan izolasyon tekniklerinin zayıflığı, kadın genital yollarının normal florasının ana bileşenlerini ve enfeksiyon etkeni patojen mikroorganizma olan anaerobik bakterilerin tespitini güçleştirmiştir. Bakteriyel vajinozis ilk olarak 1955'te Gardner ve Dukes tarafından tanımlanmıştır. Gardner ve Dukes vajinal akıntının bakteriyel vajinozisle ilgili özgün klinik belirti ve semptomlarını tanımlamıştır. Ayrıca, "*Haemophilis vaginalis*" adını verdikleri ve daha sonra *Gardnerella vaginalis* adını verdikleri "yeni" bir etken organizma tanımlamışlardır (Gardner ve Dukes, 1955). Anaerobik bakteriler daha önce tanımlanmış olsa da, Gorbach ve arkadaşlarının çalışmasıyla rapor edilmiştir (Gorbach ve diğ, 1973). Gorbach ve arkadaşları üreme çağındaki kadınların

vajinal florası ölçümlerinde anaerobik bakterilerin aerobik bakterilere oranının yaklaşık 10:1 oranında olduğunu göstermiştir. Ergen kadınlarda anaerobik bakteri prevalansının daha yüksek olduğu görülse de, ilerleyen yaş, cinsel aktivitenin başlangıcı ile aerobik bakterilerin daha çok olduğu görülmüştür (Gorbach ve diğ., 1973). Östrojen replasman tedavisi alan veya almayan menopoz sonrası kadınlar üzerinde yapılan bir araştırmada ise, bu tür bir tedavinin fakültatif organizmalar üzerinde hiçbir etkisi olmadığını bulmuştur. Bunun yanı sıra, bu çalışmada anaerobik izolatlar, bu tür tedaviyi alan kadınlar arasında daha az yaygın olma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Ancak istisna olarak, östrojen tedavisi alan kadınların dokularında anaerobik laktobasillerin daha yaygın olduğu görülmüştür (Gopplerud ve diğ., 1976). Aynı zamanda sırasıyla Ohm ve Galask, Galask ve arkadaşları ve Hill anaerobik bakterilerin hem sağlığın korunmasında hem de hastalığa neden olmadaki rolünü daha açık bir şekilde tanımlamışlardır (Hill, 1980; Galask ve diğ., 1976; Ohm ve Galask 1975). 1977'de Bartlett, menstrual döngü boyunca aralıklarla beş gönüllüden toplanan örnekler üzerinde kantitatif bakteriyoloji yapmıştır (Bartlett ve diğ., 1977). Anaerob konsantrasyonlarının menstrual döngü boyunca nispeten sabit seviyelerde bulunduğunu, ancak aerobik bakteri konsantrasyonlarının menstrüasyon öncesi haftada azaldığını bulmuştur (Sautter ve Brown, 1980). Son yıllarda yapılan çalışmalarda vajinal enfeksiyona neden olan anormal vajinal ortamı ve bu ortama neden olabilecek mikroorganizma türünün dengesizliği yada patojenitesiyle ilgili daha belirgin sonuçlar elde edilmiştir. Bunlardan en belirgin ve yaygın olanları, Bakteriyel Vajinoz (BV), Lenfogranuloma venereum (LGV), Trikomonas vajiniti ve Vajinal Kandidiyazistir.

### **1.9.1 Bakteriyel vajinoz (BV)**

Normal ve anormal vajinal mikrobiyota henüz tam olarak anlaşılacakla beraber, vajinal mikrobiyota genetik, çevresel, etnik ve davranışsal faktörlerden etkilenen bir ekosistemdir. 200'den fazla bakteri türü, kommensal, geçici ve endojen, vajeni kolonize etmekte ve vücudun diğer mikrobiyotalarından etkilenmektedir (Mendling, 2016). *Laktobacillus* türleri esas olarak vajinal mikrobiyotaya hakim olup enfeksiyonlara karşı bir savunma sistemi oluştursa da istenmeyen enfeksiyon durumları gerçekleşebilmektedir.

Bakteriyel vajinoz (BV), dünya çapında doğurganlık çağındaki kadınlarda yaygın olarak görülen ve cinsel yolla bulaşan vajinal enfeksiyon hastalığıdır ve vajinal enfeksiyonların 1/3'ünü oluşturmaktadır (Kamga ve diğ., 2019). Yapılan çalışmalarda BV prevalansı % 26-29 arasında değişmektedir (Koumans ve diğ., 2007; Kamga ve diğ., 2019). Etiyolojisi tam

olarak bilinmemekle beraber, üreme çağındaki kadınlarda, olumsuz cinsel sağlık ve üreme sağlığı sonuçlarıyla ilişkili polimikrobiyal vajinal bir hastalıktır. BV, ya asemptomatik ya da semptomatik olarak sınıflandırılabilen ve vajenin normal mikrobiotasının bozulmasıyla meydana gelmektedir (Brotman, 2011). Vajinal floraya hakim olan *Lactobacillus* türlerinde bir azalma ve aynı zamanda tek başına veya kombinasyon halinde fakültatif ve anaerobik bakterilerin aşırı üremesiyle karakterizedir. Aşırı üreyen bu bakterilere *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides fragilis*, *Atopobium vajina*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus*, *Sneathia*, *Leptotrichia*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Veillonella spp*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Fusobacterium spp.* ve *Enterobacteriaceae* üyeleri örnek verilebilmektedir. Bu mikroorganizmalar genellikle sağlıklı vajinal florada az oranda bulunmakla birlikte sayısındaki orantısızlık BV belirtici olarak görülmektedir (Şekil 1.12.) (Kamga ve diğ, 2019).

BV, çevresel ve genetik faktörlerden etkilenmektedir (Verstraelen ve diğ, 2009). Bununla birlikte kadınlardaki östrojen seviyesi azaldığında, vajinal laktobasillerin sayısı ve çeşitliliği etkilenir ve bu da bazı kadınlarda vajinal enfeksiyonlar için bir risk faktörü oluşturmaktadır. BV uzun süredir *G. vaginalis*'in varlığı ile ilişkilendirilmiştir. Şimdiye kadar dört farklı *G. vaginalis* suşu tanımlanmıştır, bunlardan sadece ikisi BV belirtici ve yalnızca biri BV'li kadınlarda baskın olduğundan bu mikroorganizmanın varlığı BV'nin ön koşulu olarak değerlendirilmemektedir (Jayaprakash ve diğ, 2012). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, tek başına hiçbir suşun BV'nin nedeni olmadığı belirtilmekle beraber, BV ile ilişkili bakterilerin tamamı henüz tam olarak tanımlanmamıştır. (Marrazzo ve diğ, 2012; Hillier ve diğ, 2010). Bununla ilgili yapılan bir çalışmada, *L. iners* varlığının BV ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu ortaya konmuştur. *L. iners* normal vajinal mikrofloranın elemanı olduğu halde, varlığı normal mikrobiyotadan anormal mikrobiyotaya geçişle güçlü bir şekilde bağlantılıdır. Öte yandan, *L. criptatus*'u vajinal florada taşıyan kadınların, BV geliştirme riski diğerlerine göre önemli ölçüde daha azdır (Fredricks ve diğ, 2005).

### **1.9.2 Lenfogradüloz venereum (LGV) - *Chlamydia trachomatis* vajiniti**

Lenfogradüloz venereum (LGV), *Chlamydia trachomatis*'in neden olduğu, lenf bezleri ve vajinal bölgede inflamasyon ile karakterize olan cinsel yolla bulaşan bir hastalıktır. 3-30 günlük bir kuluçka döneminin ardından seyir gösteren ciddi bir vajinal enfeksiyondur (Biruni Laboratuvarı, 2016). *C. trachomatis*, dünya çapında özellikle sanayileşmiş ve

gelişmekte olan ülkelerde cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların (CYBE) en önde gelen nedenlerinden biridir ve önemli morbidite oranına sahiptir. *C. trachomatis*, zorunlu hücre içi bakterisidir ve dünya genelinde yılda 100 milyondan fazla yeni vakaya sebep olmaktadır (Senior, 2012). *C. trachomatis*'in sebep olduğu CYBE'lerin çoğu asemptomatiktir ve bu nedenle tedavi edilmeden bırakılmaktadır. Tedavi edilmeyen klamidyal enfeksiyon, özellikle genç kadınlarda hem bulaşa hem de assendan enfeksiyon ile ciddi pelvik inflamatuvar hastalık, infertilite, ektopik (dış) gebelikler ve erken doğumlar gibi ciddi durumlara neden olmaktadır (Stamm, 1999; Haggerty ve diğ., 2010; Gencay ve diğ., 1997, 2001). *C. trachomatis* enfeksiyonu, yenidoğanlarda erken doğum, düşük doğum ağırlığı, konjonktivit, nazofaringeal enfeksiyon ve pnömoni gibi ciddi hastalıklarla sonuçlanabilmektedir (Stamm, 1999).

Şimdiye kadar, *C. trachomatis*'in oluşturduğu hastalığın patogenezinin sorumlu tutulabilecek toksin ya da herhangi bir virülans faktörü tanımlanmamıştır. *Chlamydia* enfeksiyonlarının tipik özelliği, konakta çoğu kez persistan (yavaş gelişen) enfeksiyonlara yol açmasıdır. *Chlamydia*'lar doğal konaklarında daha çok subklinik (belirti göstermeyen) enfeksiyonlara yol açmaktadırlar. *Chlamydia* enfeksiyonlarında mikroorganizmaya karşı çeşitli antikorlar oluşturulsa da bu antikorların tekrarlayıcı enfeksiyonlara karşı koruyucu özellikleri çok az ve kısa sürelidir (Biruni Laboratuvarı, 2016).

*C. trachomatis* iki farklı bakteri formuna sahip özgün bir gelişim döngüsü göstermektedir. Temel beden (elementary body-EB) bulaşıcıdır ve bölünmez, ancak ağsı beden (reticulate body-RB) bulaşıcı değildir ve replikatiftir (Moulder, 1991). Hücrelere bağlanma ve penetrasyondan sonra, EB'ler fago-lizozomal füzyondan kaçan vakuollerin içinde kalır. İnküzyonlar olarak adlandırılan bu vakuoller içinde, EB'ler birkaç dönüşümden sonra RB'lere farklılaşır. EB'lerin aksine, RB'ler daha büyük, metabolik olarak daha aktif, daha az sıkıştırılmış ve binary fizyonla bölünebilme yeteneğine sahiptir. *C. trachomatis*, enfeksiyondan yaklaşık 18 saat sonra, binary fizyonla RB'lere farklılaşmaktadır. Enfeksiyondan 48-72 saat sonra ise ya ekzositoz ya da hücrel lizis yoluyla hücreden atılacak olan EB'lere farklılaşmaktadır (Şekil 1.12.) (Wyrick, 2000).

### 1.9.3 Trikomonas vajiniti

Trikomonas vajiniti dünya çapında yaygın olarak cinsel yolla bulaşan hastalıklardan biridir. Kadınları menarş sonrası dönemde etkiler ve yılda yaklaşık 143 milyon vaka sayısı ile karakterizedir (WHO, 2015). Kadınlarda amniyotik membranın erken rüptürüne neden

olduğu için, erken doğuma ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerin doğmasına neden olmaktadır (Cotch ve diğ, 1997; Hardy ve diğ, 1984; Minkoff ve diğ, 1984). Kadınlarda İnsan immün yetmezlik sendromu (HIV) enfeksiyona eğilimin artmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda servikal kanser gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (Stark ve diğ, 2009; Laga ve diğ, 1993; Gram ve diğ, 1992).

*Trichomonas vaginalis*, trikomonas vajinitine sebep olan, konakçı vajinal hücrelerin yüzeyine yapışan hücre dışı parazitik bir protozoondur. *T. vaginalis*'in vajinal epitel hücrelerine yapışması, enfeksiyonu başlatmak için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, bu kamçılı protozoon morfolojik değişikliğe uğrayarak serbest yüzen bir oval şekilden konakçıya yapışan bir amoeboid şekle dönüşmektedir (Elmendorf ve diğ, 2010; Rendón-Maldonado ve diğ, 1998; Gonzalez-Robles ve diğ, 1995). Kadınlarda *T. vaginalis*'in sebep olduğu enfeksiyonlar % 80 oranda asemptomatiktir ve yani hiçbir belirti vermez ve rutin jinekolojik muayene sırasında tesadüfen saptanabilmektedir.

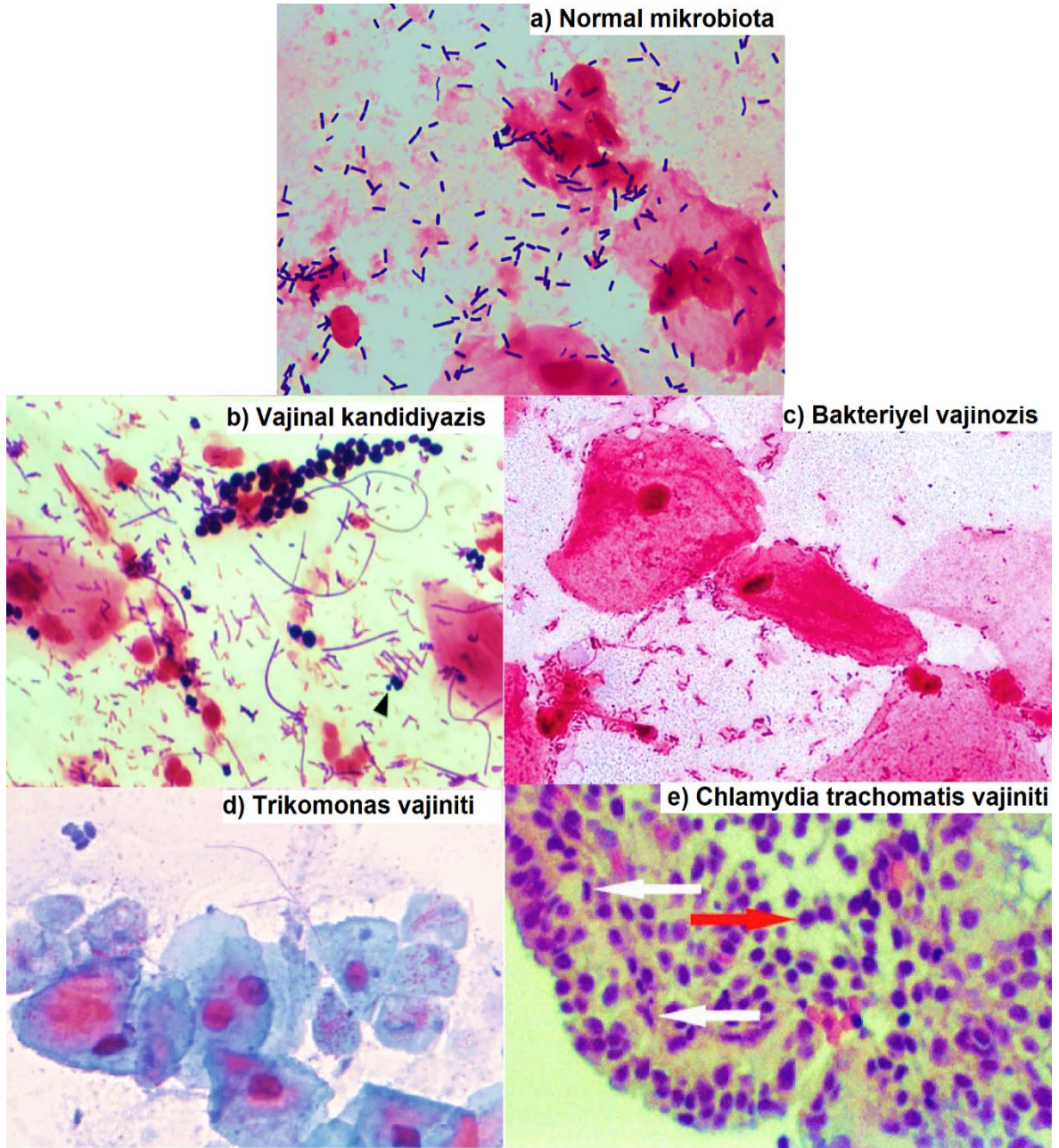
#### 1.9.4 Vajinal kandidiyazis

Vajinal *Candida*, % 37'lik bir oranla en sık görülen *Candida* enfeksiyonu türü olmakla birlikte, toplamda 368 milyon dolar maliyetle ekonomik yüke sebep olan bir hastalıktır. (Benedict ve diğ, 2019). Yapılan araştırmalarda, vajinal kandidiyazisin 100.000 kadında 3871 küresel yıllık prevalansla tüm dünyada yılda yaklaşık 138 milyon kadını etkilediğini bildirilmektedir (Denning ve diğ, 2018). Ülkemizde ise hastanede yatan hastalarda fungal enfeksiyonların sıklığı son 20 yılda belirgin şekilde artmıştır (Karakoç, 2019). Yatan hastalarda yoğun bakım ünitesi de dahil olmak üzere %12.5 oranında mantar enfeksiyonu saptanmıştır. Mantar enfeksiyonlarının 1/3'ü yoğun bakım ünitesinden izole edilmiştir (Özçetin ve diğ, 2009).

Kadınlarda en az % 75'i hayatlarında bir kez vajinal kandidiyazis enfeksiyonu geçirmektedir. Vajinal kandidiyazise neden olan en yaygın mantar türü *Candida albicans* olup bunu non-*albicans Candida* türleri takip etmektedir (İlkit ve Güzel, 2011). Vajinal kandidiyazis vakalarının % 85-90'ından fazlası esas olarak *C. albicans*'tan, ardından % 4-5 ile *C. glabrata*'dan ve daha azı ise *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*'ten kaynaklanmaktadır (Jeanmonod ve Jeanmonod, 2019; Pappas ve diğ, 2009). Vajinal kandidiyazis vakalarının çoğunda bulunan *C. albicans* ve *C. glabrata* izolatlarının diğer *Candida* türlerine göre antifungal ilaç direncinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Son yıllarda non-*albicans* türlerin ve antifungal direnç oranlarının artması sebebiyle de tedavi güçleşmekte ve uzun

vakit almaktadır. Uzun süren tedavi süreci için dünya çapında her yıl milyonlarca dolar harcanmakta ve ayrıca hastalar antifungal ajanların ağır yan etkilerine de maruz kalmaktadır. Vajinal kandidiyazis tüm dünyada yaygın olarak rastlanılan yıllık % 30-50 insidansa sahip bir hastalıktır.

Vajinal kandidiyazis genellikle üreme çağındaki kadınlarda görülmektedir (Jeanmonod ve Jeanmonod 2019; Fong, 1996). Kontrolsüz diyabet, yüksek östrojenli kontraseptiflerin kullanımı, steroidler ve geniş spektrumlu antibiyotikler gibi çeşitli faktörler kadınları vajinal kandidiyaza yatkın hale getirmektedir (Jeanmonod ve Jeanmonod 2019). Vajinal kandidiyaz tedavisinde imidazol antifungaller (butokonazol, klotrimazol, mikonazol), triazol antifungaller (flukonazol, terkonazol) ve polien antifungaller (nistatin) intravajinal veya oral yoldan kullanılmaktadır (Pappas ve diğ, 2016; Soong ve Einarson 2009; Fong, 1996).



**Şekil 1.12:** a) Normal vajinal floradan (Parallel Universe, 2021) b) Vajinal kandidiyazisli hastadan (Newman, 2011), c) Bakteriyel vajinozisli hastadan (Fujisaki, 2020) d) Trikomonas vajiniti hastadan (Wikimedia Commons, 2019) e) *C. trachomatis* vajiniti hastadan alınan (Toth, 2021) örneklerin karşılaştırmalı Gram boyama sonrası görüntüleri.

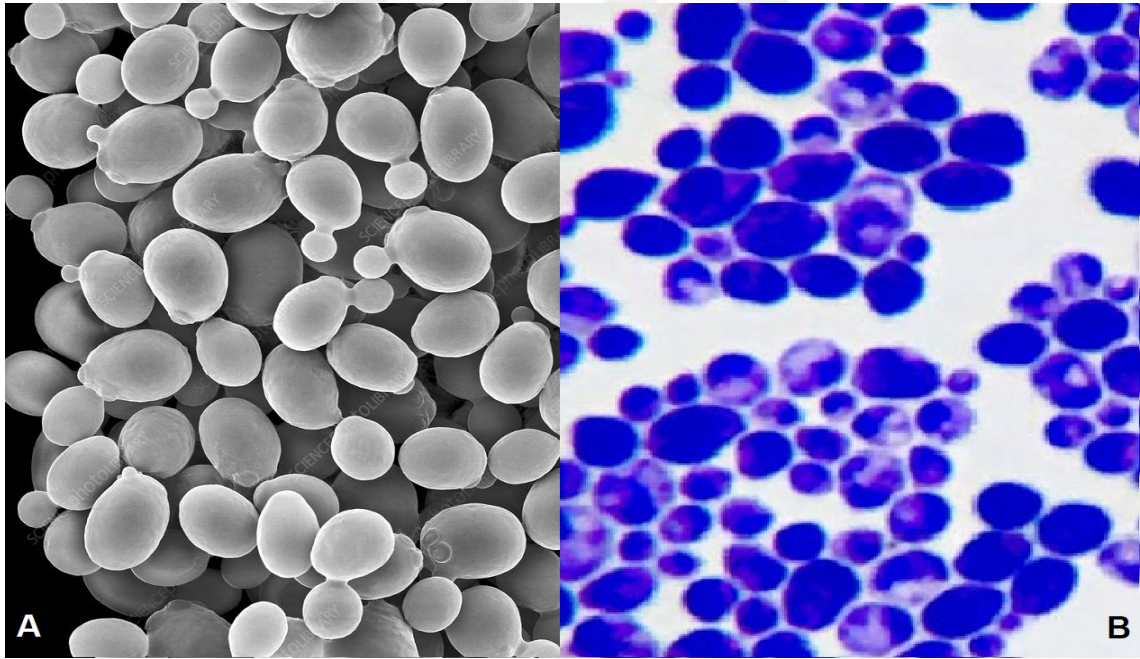
#### 1.9.4.1 *Candida albicans*

*Candida albicans*, ağızda, bağırsak sisteminde ve vajende (vajinal kandidiyazis) enfeksiyona neden olabilen mantar türüdür. Aynı zamanda cilt ve diğer mukoza zarlarını etkileyebilmektedir. Konak bağışıklık sistemi iyi bir şekilde çalışıyorsa, bu tip mantar enfeksiyonu çok ciddi sonuçlar doğurmamaktadır. Ancak, bağışıklık sisteminin düzgün çalışmadığı durumlarda *Candida* enfeksiyonu, kalbin veya beynin çevresindeki kan ve

zarlar da dahil olmak üzere vücudun diğer bölgelerine geçerek ciddi semptomlara neden olabilmektedir. Bu duruma ise invaziv kandidiyazis denmektedir (Kuran, 2021).

*C. albicans*, vücutta olması gerektiği seviyelerde bulunduğu besin emilimine ve sindirime yardımcı olan bir mantardır. Aşırı ürediğinde, tipik *Candida* semptomları ortaya çıkabilmektedir. Sindirim sisteminde, kontrol edilmediği durumlarda, bağırsak duvarlarını yıkarak kan dolaşımına nüfuz etmektedir. Bunun sonucunda, *Candida* sentezlediği toksinleri serbest bırakarak geçirgen bağırsak sendromuna neden olmaktadır (Kuran, 2021).

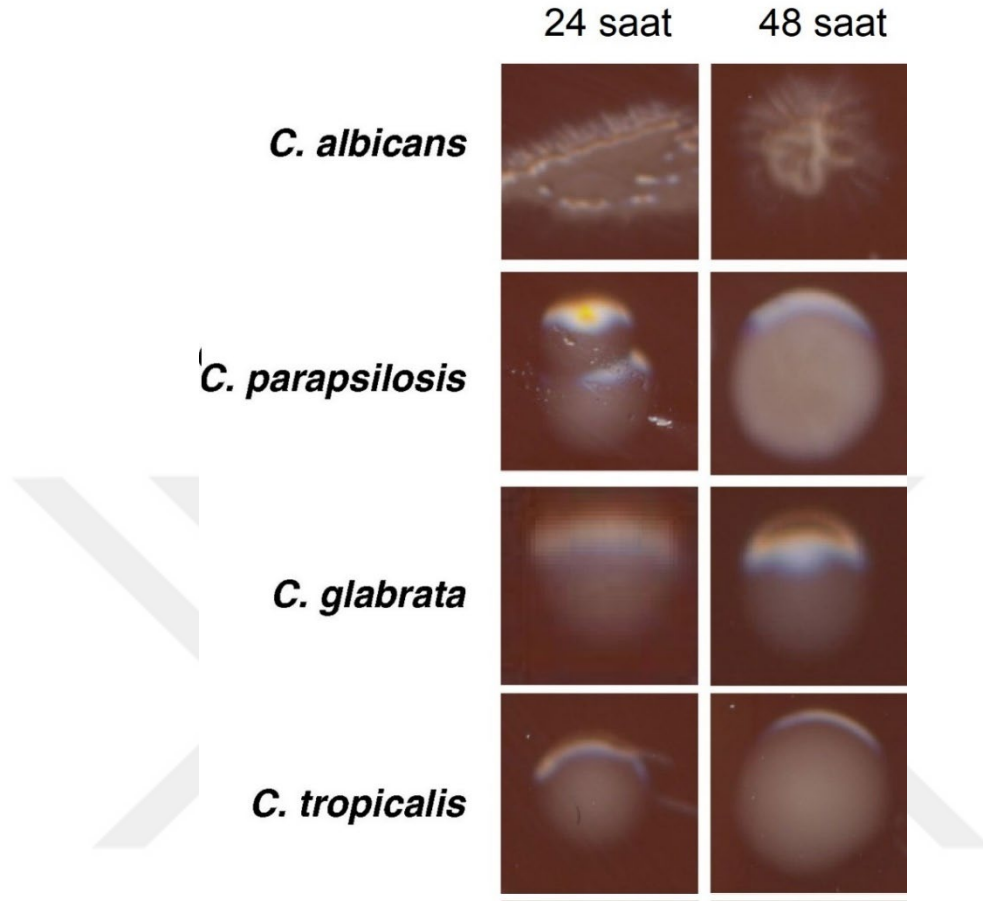
*C. albicans*, hüresel yüzeyi oval, 2-4 µm. büyüklüğe sahip, tek hücreli mikroorganizmalardır. Tomurcuklanarak çoğalırlar ve gram boyamada Gram pozitif olarak görünmektedir (Şekil 1.13.). Ayrıca, bazı suşları biyofilm oluşturmaktadır. Hücre duvarının %80-90'ı karbonhidratlardan oluşmaktadır. Genel olarak Saboraud Dekstroz besiyerinde (pH 5.6) kültürü yapılmaktadır.



**Şekil 1.13:** A. *C. albicans*'ın taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü (Kunkel, 2021).  
B. *C. albicans*'ın ışık mikroskopundaki Gram boyama görüntüsü (Happy Science, 2021).

Yapılan bir çalışmada *C. albicans* ve non-*albicans Candida* türleri (*Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* ve *Candida tropicalis*)'nin karşılaştırmalı değerlendirilmesi yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada *C. albicans* ve non-*albicans Candida* türlerinin Çikolatamsı agar üzerine inokülasyonu yapılmış, 24. ve 48. saatlerdeki koloni morfolojileri gözlenmiştir. *C. albicans*, dış sınırları boyunca filament oluşturan kremi-gri koloniler oluştururken; non-

*albicans* *Candida* türleri genellikle pürüzsüz, yapışkan, ipliksi olmayan koloniler oluşturmaktadır (Şekil 1.14.) (Sheth ve diğ, 2005).



**Şekil 1.14:** *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis*'nin Çikolatamsı agar üzerindeki 24. ve 48. saatlerdeki koloni görüntüleri (Sheth ve diğ, 2005)

#### 1.9.4.2 Non-*albicans* *Candida* türleri

*Candida* türlerinin oluşturdukları enfeksiyon, büyüme için uygun koşulları sağlayan kutanöz tabakayı ve mukoza zarını etkilemekte ve ağız, deri, vajen ve bağırsaklarda enfeksiyonlara neden olmaktadır. Non-*albicans* *Candida* türleri, tüm mantar hastalıklarının % 35-65'ini oluşturmaktadır. Kanser hastalarında, hematolojik maligniteleri olan hastalarda ve kemik iliği nakli olan hastalarda % 40-70 oranıyla daha sık görülürken, yoğun bakım ve cerrahi hastalarda % 35-55, çocuklarda % 1-35, ve HIV pozitif hastalarda % 0-33 oranla daha az görülmektedir (Krcmery ve Barnes, 2002). Mantar hastalıklarına sebep olan *Candida* türleri arasında non-*albicans* *Candida* türlerinin oranı yıldan yıla artmaktadır. 1990'a kadar geçen yirmi yılda, non-*albicans* *Candida* türleri tüm mantar hastalıklarının % 10-40'ına sebep olurken, 1991-1998 yılları arasında % 35-65'ini sebep olmaktadır. En yaygın görülen non-*albicans* *Candida* türleri % 20-40 oranla *C. parapsilosis*, % 10-30

oranla *C. tropicalis* , % 10–35 oranla *C. krusei* ve % 5–40 oranla *C. glabrata*'dır. Bunların dışındaki non-*albicans* *Candida* türleri ise insandaki mantar hastalıklarının % 1'inden daha azına sebep olmaktadır. non-*albicans* *Candida* türlerine bağlı ölüm oranı % 15 ile % 35 arasındadır ve bu oran *C. albicans*'tan kaynaklanan ölüm oranına (% 20-40) yakındır (Krcmery ve Barnes, 2002). Non-*albicans* *Candida* türleri arasında, vajinal candidiyazise sebep olan en yaygın türler ise yine *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*'dir (Sheth ve ark.2005). Bu nedenle tez çalışmamızda, biyoteknolojik yöntemler kullanılarak ürettiğimiz Mikrobiyal KS'nin *C. albicans*'ın yanında özellikle bu non-*albicans* *Candida* türleri üzerindeki antifungal etkinliğine bakılmış ve aynı zamanda bu mantar türlerini inhibe edecek minimum Mikrobiyal KS miktarları, her bir *Candida* türü için ayrı ayrı tayin edilmiştir.

*Candida glabrata*, 1 ile 4 µm boyutlarında, 37°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda psödohip oluşturmayan tek *Candida* türüdür. *C. glabrata* Sabouraud dekstroz agarda diğer *Candida* türlerine benzer, parlak, pürüzsüz, krem renkli, ancak boyut olarak nispeten daha küçük koloniler oluşturmaktadır (Fidel ve diğ, 1999). *C. glabrata* insanda kommensal olarak yaşayan en yaygın *Candida* türlerinden biridir. Sağlıklı bireylerde hastalığa sebep olmazken, HIV/AIDS hastaları, diyabet hastaları, kemoterapi hastaları, organ nakli hastaları, yatan cerrahi hastaları dahil olmak üzere bağışıklık fonksiyonları baskılanmış kişilerde Kandidal enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bağışıklığı baskılanmış hastalarda kan dolaşımına girdikten sonra genelde ürogenital sistem enfeksiyonlarına ve sistemik enfeksiyonlara neden olmaktadır. *C. glabrata*, genellikle hastane kaynaklı yüzeysel (oral, özofagus, vajinal veya üriner) veya sistemik kandidal enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Lagrotteria ve diğ, 2007; Fidel ve diğ, 1999).

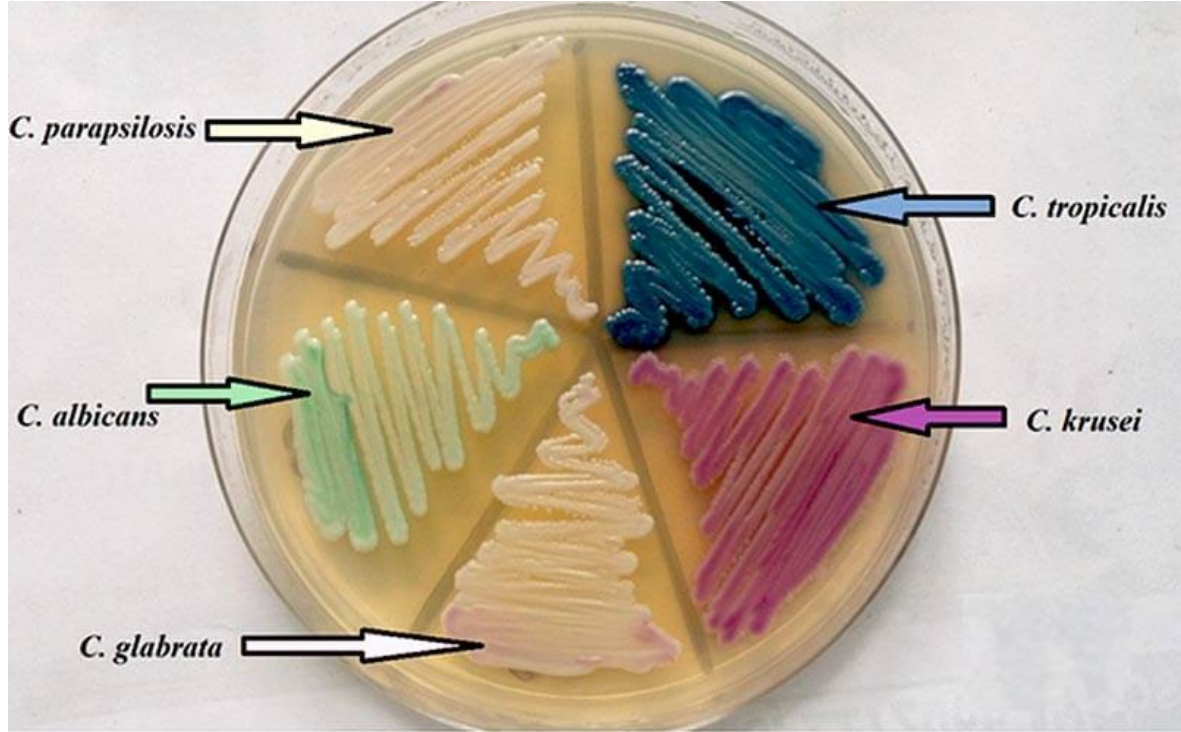
*Candida tropicalis*, genellikle oval şekilli, 2-10 µm büyüklüğünde, optimum 25–35 °C sıcaklıkta büyüyen vejetatif hücrelerdir. Kültür ortamında agar yüzeyinde kırmızı, pembe veya turuncu renkli pigmentler üretmektedir. Unipolar veya bipolar tomurcuklanarak çoğalmaktadırlar. Konidia (blastoconidia) tomurcukları, iğne şeklindeki saplarda oluşur. Sabourand dekstroz agar yüzeyinde krem rengi veya kirli beyazdan griye, donuk, pürüzsüz, yumuşak ve kremsi veya buruşuk ve pürüzlü koloniler üretmektedir. *C. tropicalis*, insan derisinde, gastrointestinal sistemde ve ayrıca kadın ürogenital sisteminde enfeksiyonlara neden olan en yaygın *Candida* türlerinden biridir (Katragkou ve diğ, 2017). Özellikle bağışıklığı baskılanmış kişilerde, vücudun çeşitli organlarında kandidiyazis olarak adlandırılan mantar enfeksiyonuna neden olmaktadır. En yaygın bulaş şekli, hastane

kaynaklı olup hastalar ve sağlık çalışanları arasındaki bulaşmadır. *C. tropicalis* epitelyal ve endotelyal hücre yüzeylerinde biyofilm oluşturarak ve proteaz gibi enzimatik enzimleri salgılayarak konak hücreye yapışmakta ve hücreye nüfuz etmektedir. Proteaz enzimleri, peptit bağlarını hidroliz eder ve *C. tropicalis*'in derin dokulara tutunmasını ve kolonizasyonunu desteklemektedir (Arajo ve diğ, 2017; Praneenararat, 2014).

*Candida parapsilosis*, ilk olarak Ashford tarafından 1928'de keşfedilmiştir. ncesinde *Monilia parapsilosis* olarak adlandırılmış, daha sonrasında *C. parapsilosis* olarak yeniden adlandırılmıştır. *C. parapsilosis* hücreleri oval, yuvarlak veya silindirik şeklinde, çoklu morfojenetik formlarda bulunmaktadır. Ya bir maya formunda ya da bir psödohif formda bulunmaktadır ve Sabouraud dekstroz agar yüzeyinde beyaz, kremsi, parlak, pürüzsüz veya buruşuk koloniler üretmektedir. *C. parapsilosis* insan derisinin tipik kommensali olsa da bağışıklığı baskılanmış hastalarda, yoğun bakım ünitelerinde yatan özellikle cerrahi hastalarında ve yenidoğanlarda sepsis, yara ve doku enfeksiyonlarına neden olmaktadır. *C. parapsilosis*, kalp cerrahisi hastalarında fungal endokardit enfeksiyonunun %17'sini oluşturmaktadır (Trofa ve diğ, 2008; Weems Jr, 1992). Hidrolitik enzimlerin salgılayarak ve biyofilm oluşturarak patojenik özelliğini göstermektedir. *C. parapsilosis*, özellikle tıbbi cihazların yüzeylerine yapışan psödohif filamentlerinden oluşan biyofilmler oluşturmaktadır. Cihaz yerleştirilmesi sırasında mantarların cihaza giriş yaptığı cilt yüzeylerinde de biyofilm oluşumu meydana gelebilmektedir. Dolayısıyla, vücut dokularında hastalığın yayılmasını artıran biyofilmler oluşabilmektedir. Biyofilm oluşturma özellikleri antifungallere karşı direnci sağlamaktadır. Aynı zamanda aspartik proteinazlar (Saps), fosfolipazlar ve lipazlar gibi hidrolitik enzimler salgılayarak patogenezi sağlamaktadırlar (Trofa ve diğ, 2008; Nyirjesy 2005).

*Candida krusei*, hücreleri oval silindirik veya uzun 2.0- 5.6x 4.0- 15 m boyutlarında, fırsat bir mantar patojenidir. *C. krusei*'nin blastokonidia'ları tipik olarak 25 m uzunluğunda ve genellikle "kibrit p" şeklinindedir. *C. krusei* diğer *Candida* türlerinden farklı olarak, vitamin içermeyen besiyerlerinde üreyebilmektedir. Sabouraud dekstroz agar yüzeyindeki kolonilerini *C. albicans* ve diğer non-*albicans Candida* türlerinin oluşturduğu kolonilerden ayırmak gttr. En çok hematolojik malignitesi olan hastalarda ve kan ve ilik nakli olan hastalarda enfeksiyona ve kolonizasyona sebep olmaktadır (Pfaller 2008). Bu tür diğer *Candida* türlerinden farklı olarak, sağlıklı kişilerin mukozal yüzeylerinden elde edilmemesine rağmen, vajinal kandidiyazisin önemli bir etkenidir. *C. krusei* nemli bir antifungal ajan olan flukonazole karşı doğuştan gelen bir dirençle birlikte diğer ilaçlara

karşı azalmış duyarlılığı bulunmaktadır (Pelletier ve diğ, 2005). Yapılan bir çalışmada, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*'nin kromojenik bir kültür ortamı olan Kromagar yüzeyine ekimi yapılmış ve mantar türlerinin agar yüzeyinde oluşturdukları koloni renkleriyle kimliklendirilmesi yapılmıştır (Şekil 1.15) (Kalaiarasan ve diğ, 2017).



**Şekil 1.15:** Kromagar üzerine ekimi yapılmış *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* kolonileri (Kalaiarasan ve diğ, 2017)

Kromagar, 1979 yılında *E. coli* identifikasyonu için Dr. A. Rambach tarafından icat edilmiş ilk kromojenik kültür ortamıdır. Bu teknoloji renk bazlı farklılaştırma yöntemidir. Belirli bir enzimatik aktiviteyi hedefleyen bir substrattan ve bir kromofordan oluşan çözünür renksiz moleküllerden oluşmaktadır. Hedef organizmanın enzimi renksiz kromojenik konjugatı parçaladığında, kromofor serbest bırakılır. Konjuge olmayan formunda, kromofor kendine özgü rengini sergilemektedir. Bu besiyerinde, belirli mikroorganizmaların kolonileri bir bakışta renklerinden tanınabilmektedir (DRG, 2009).

Tüm bu veriler ışığında, vajinal mikrofloraya hakim *Lactobacillus* türlerindeki çeşitli değişiklikler enfeksiyonla sonuçlanabilmekte, ve vajinal dokunun ekstrasellüler matriksinde bulunan KS'nin de fonksiyonel yapısını bozarak buradaki etkinliğini azaltabilmektedir. Bu nedenle, biyoteknolojik yöntemlerle oluşturduğumuz rekombinant bakteri kaynaklı Mikrobiyal KS'nin antifungal etkinliği çalışılmıştır. Mikrobiyal KS'nin her hangi bir yan etkiye sahip olmaması, tamamen biyoyumlu, toksik olmayan ve

antialerjik özelliklere sahip olması, mevcut hayvansal kaynaklı yada sentetik KS'lere göre ciddi avantaj sağlamaktadır. Çalışmamızın sonucunda antifungal aktivitesi belirlenen Mikrobiyal KS hem vajinal bağ dokudaki GAG yapısını destekleyecek hem de burada oluşabilecek muhtemel Candidal enfeksiyonlarının önüne geçebilecektir.

### **1.10 Antifungal Ajanlar ve Etki Mekanizmaları**

Antimikrobiyaller, bakteriler ve mantarlar gibi mikroorganizmaların varlığını azaltma gücüne sahip, aynı zamanda enfeksiyon hastalıkları tedavisinde kullanılabilen maddeleri tanımlamak için kullanılmaktadır. Patojen mikroorganizmalar, vücuda girip üremeye başladıklarında ve sağlıklı bakterileri dışarıda tuttuklarında veya normalde steril olan dokularda üremeye başladıklarında hastalıklara ve enfeksiyonlara neden olmaktadır. Mikroorganizmaların çoğalmasını sağlayan ana süreçler, hücre duvarı sentezi, hücre zarı işlevi, protein sentezi, nükleik asit sentezi vb. işlevlerdir. Dolayısıyla tüm bu süreçler antifungaller için önemli hedeflerdir. Bu nedenle, bu süreçlere farklı şekillerde müdahale eden veya bu süreçleri bozan antifungaller üç grupta incelenmektedir. Bunlar, mantar hücre duvarı sentezini bozanlar, mantar sitoplazmik membran fonksiyonunu bozanlar ve mantar DNA sentezini bozanlar olarak sınıflandırılmıştır.

#### **1.10.1 Hücre sitoplazmik membran yapısını bozan antifungaller**

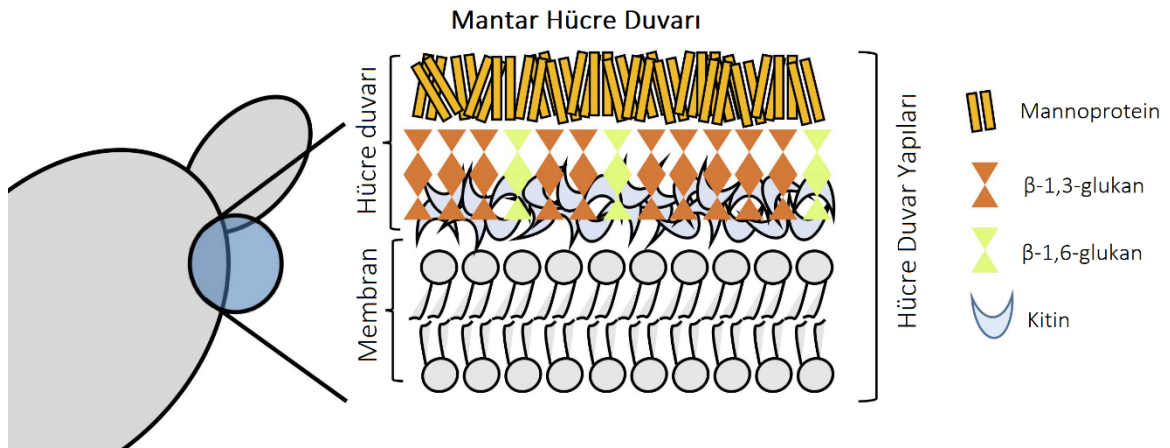
Klinik kullanımdaki üç ana antifungal ajan grubu, azoller, polienler ve allilamin/tiokarbamatların tümü, mantar sterollerini etkileyerek hücre membran yapısını bozmaktadırlar. Azoller, ergosterol sentezini engellerken (ana mantar sterolü); polienler, mantar zarı sterollerini ile fizikokimyasal olarak etkileşime girmektedirler. Bu ajanlar antifungal aktivitelerini, ergosterol sentezinin inhibisyonuna veya ergosterol ile doğrudan etkileşime borçludur. Ergosterol, mantar hücre zarının baskın bileşenidir. Ergosterol, membran akışkanlığının ve asimetrisinin ve dolayısıyla mantar hücrelerinde membran bütünlüğünün biyoregülatörü olarak hizmet etmektedir (Nozawa ve Morita, 1986).

#### **1.10.2 Mantar hücre duvarlarına karşı aktif bileşikler**

Mantar hücre duvarı, hücresel bütünlüğü ve canlılığı korumak için hayati önem taşıyan büyük plastisiteye sahip temel bir yapıdır. Hücre duvarı, hücresel geçirgenliği kontrol etmek ve hücreyi ozmotik ve mekanik stresten korumak gibi farklı biyolojik işlevlere sahiptir (Gow ve diğ, 2017; Agostinho ve diğ, 2018). Bu önemli fonksiyonlara ek olarak,

hücre duvarı, adezinler ve aktivasyonlarından sonra hücre içinde karmaşık bir sinyal dizisini tetikleyecek çok sayıda reseptör aracılığıyla dış çevre ile etkileşimlere aracılık etmektedir (Ponton, 2008). Hücre duvarı benzersiz bir şekilde polisakkaritler ve proteinlerin yanı sıra lipidler ve pigmentlerden oluşmaktadır (Gow ve diğ., 2017). Ayrıca, bazı duvar bileşenleri çok immünojeniktir ve enfeksiyon sırasında hücrel ve humoral tepkileri uyarmaktadır (Erwig ve Gow, 2016).  $\beta$ -glukanlar ve mannanların yanı sıra bunlara yönelik antikolar, invaziv mantar enfeksiyonu olan hastalarda tespit edilebildiklerinden çok faydalı enfeksiyon teşhis araçlarıdır (Pazos ve diğ., 2006). Dolayısıyla, hücre duvarı parçalanmasının hücre büyümesi ve morfolojisi üzerinde hücre ölümü ile sonuçlanan ciddi etkileri olabilmektedir.

Mantar hücre duvarı, mantar alemine özgü, mannan, kitin ve  $\alpha$ - ve  $\beta$ -glukanlar ve glikosile edilmiş proteinler gibi bileşikler içerir. Proteinler genellikle glikoproteinlerle sonuçlanan polisakkaritlerle ilişkilidir (Garcia-Rubio ve diğ., 2020). Mantar hücre duvarı insan vücudunda bulunmayan mannan, kitin ve  $\alpha$ - ve  $\beta$ -glukanlar gibi yapılardan oluştuğundan olası antifungal ajanların ideal hedefleri olarak tanımlanmıştır (Aguilar-Zapata ve diğ., 2015). Tıbbi açıdan önemli mantarların hücre duvarı bileşimi hakkındaki bilgiler, daha çok *C. albicans* ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bu mayanın hücre duvarı kitin,  $\beta$ -glukan ve mannopteinden oluşan çok katmanlı bir yapıdır.  $\beta$ -glukan ve mannopteinler hücre duvar kütlelerinin %80'ini oluşturmaktadır (Ghannoum ve Rice, 1999). Dış katmanlar mannan, mannoptein ve  $\beta$ -(1,6)-glukandan oluşurken, iç katmanlar ağırlıklı olarak  $\beta$ -(1,3)-glukan ve bir miktar mannoptein ile kitinden oluşmaktadır (Şekil 1.16).

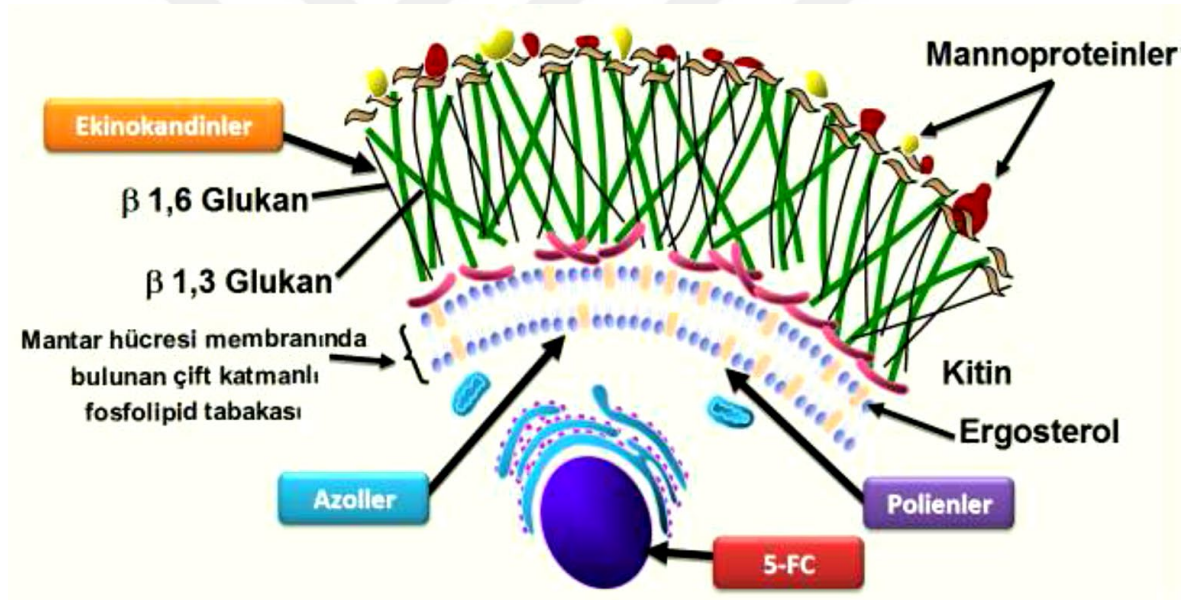


**Şekil 1.16:** Mantar hücre duvar yapısı (Garcia-Rubio ve diğ., 2020)

Lipopeptidler olan ekinokandinler,  $3\beta$ -glukan sentazın spesifik inhibitörleri olarak glukan sentezini inhibe etmektedirler. Dolayısıyla ekinokandinler, *Candida* ve *Aspergillus* türlerine karşı hem in vitro hem de in vivo fungisidal aktiviteye sahiptirler.  $\beta$ -Glukan inhibitörleri, büyük (210-kDa) bir integral membran heterodimerik proteini olan  $\beta$ -(1,3)-glukan sentetazın spesifik rekabetçi olmayan inhibitörleri olarak işlev görmektedir (Hector, 1993). Mantarlar enfeksiyonlarının bu bileşiklerle tedavisi, nükleik asit veya mannan sentezini etkilemeden yapısal glukan bileşeninin sentezini engellemektedir

### 1.10.3 Nükleik asitleri engelleyen antifungaller

5-Florositozin (5FC), esas görevi mantar hücresindeki makromoleküler sentezi inhibe etmektir. Bu ajan, permeaz enziminin yardımıyla mantar hücrelerine girerek fosforile edilerek RNA'ya dahil edilmektedir. Bu da protein sentezinin bozulmasına neden olmaktadır (Şekil 1.17) (Polak ve Scholer, 1975).



Şekil 1.17: Antifungallerin etki mekanizmaları (Erben, 2018).

Mantar hücrelerinde bulunan sitoplazmik zarındaki steroller ve fosfolipidler arasındaki etkileşimler, zarın akışkanlığını ve asimetrisini etkilemekte ve sonuç olarak maddelerin zarlar boyunca taşınmasını etkilemektedir. Mantar hücresi tarafından alınan ilaç miktarında bir azalma, mantar hücre zarının sterol ve/veya fosfolipid bileşimindeki değişikliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Ghannoum ve Rice, 1999).

Mantar hücre duvarında, glukanlar, kitin ve glikoproteinlerin yanı sıra melatonin pigmentinin de bulunduğu bildirilmiştir. Melanin, negatif yüklü, hidrofobik ve sulu çözeltilerde çözünmeyen yüksek moleküler ağırlıklı bir pigmenttir ve mantarları konakçıda

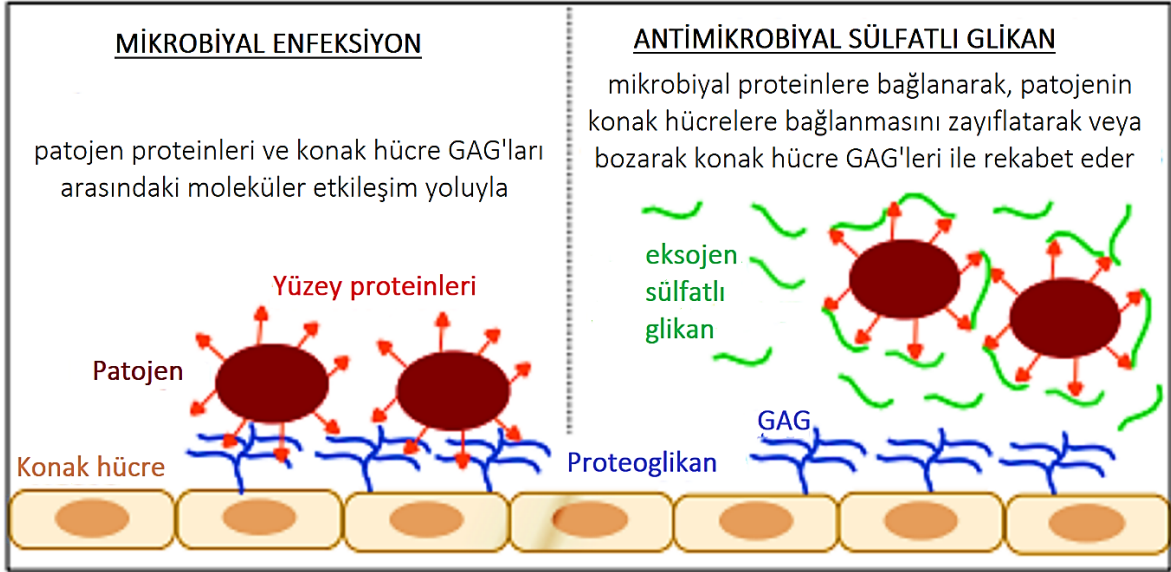
hayatta kalmayı kolaylaştıran stres faktörlerine karşı korumaktadır (Nosanchuk ve diğ, 2015). Melanin üretimi mantar virülansına katkıda bulunarak aşırı sıcaklık, UV ışığı ve toksinler gibi çevresel hasara karşı direnci artırmaktadır (Silva ve diğ, 2009; Eisenman ve Casadevall, 2012)

### **1.11 KS ve Antimikrobiyal Etki Mekanizması**

Antimikrobiyal ajanlar olarak anyonik ve katyonik polimerlerin antimikrobiyal etkinliğini açıklayan birçok rapor yayınlanmıştır. Bu raporlara göre, katyonik polimerler için antimikrobiyal mekanizma, polimerlerin katyonik kısımları ile anyonik yapılar arasındaki elektrostatik etkileşimdir. Katyonik polimerler, bakteri veya mantar hücre zarlarının anyonik olan fosfat gruplarıyla gerçekleştirdiği elektrostatik etkileşim ile antimikrobiyal etki göstermektedir. Aynı etkileşim bu polimerlerin hidrofobik kısımları ile mikroorganizma lipid zarının hidrofobik bölgeleri arasında da gerçekleşmektedir. Bu etkileşimler, membran yapısını bozarak sitoplazmik materyalin sızıntısına ve bunun sonucunda hücrelerin lizise uğrayarak parçalanmasına yol açmaktadır. Kondroitin sülfat gibi polianyonik polimerlerin antimikrobiyal özelliklerinin benzer etkileşimlerle gerçekleştiği belirtilmektedir. Katyonik kısımların polimer omurgasına kovalent olarak bağlı olduğu, anyonik polimerlerin nispeten serbest katyonları, hücre duvarının anyonik fosfat grupları ile daha kolay etkileşime girmektedir. Dolayısıyla anyonik polimerlerdeki serbet katyonlar hücre membranındaki fosfat gruplarına bağlanarak hücre membran yapısını bozmakta ve hücrenin lizisine neden olmaktadır (Guo ve diğ, 2017; He ve diğ, 2020). Tezimizde, polianyonik bir GAG olan, KS'nin ve düşük mA yüksek etkinlikli mikrobiyal formu olan MKS'nin gösterdiği fungisidal ve fungisitatik etkisi gözlemlenmiş, test edilmiş ve sonuçlar tartışılmıştır.

Proteoglikanların kantitatif tayini için çoğu test, katyonik boyaların veya maddelerin GAG polianyonik kısımlarına bağlanmasını kullanmaktadır. Polikatyon ne kadar katyonik olursa elektrostatik etkileşim o kadar yüksek olmakta ve fizyolojik çözeltilerden çöktürülen kararlı komplekslerle sonuçlanmaktadır. Bu özellik, doku ve biyolojik sıvılardan GAG'ın izolasyonu ve saflaştırılmasını kolaylaştırmaktadır. Sülfatlanmış glikanların ekzojen olarak ortama verilmesi, patojen proteinlerin konakçı hücrelere bağlanması ve yapışması için gerekli olan fizyolojik GAG'lar ile rekabete yol açabilmektedir. Bu moleküler girişim mekanizması, antimikrobiyal etki ile sonuçlanmaktadır. Şekil'de görüldüğü gibi, patojen proteinler ve konak hücre GAG'ları arasındaki etkileşim yoluyla patojen

mikroorganizmalar konak hücre yüzeyine bağlanarak etkinliğini göstermektedirler. Eksojen GAG'lar ortama konulduğunda, konak hücre GAG'leri ile rekabet eder ve mikrobiyal proteinlere bağlanır ve böylece patojenin konak hücrelere bağlanmasını engellemektedir (Şekil 1.18) (Pomin, 2017).



Şekil 1.18: GAG'ların antimikrobiyal etkisi (Pomin, 2017).

Bununla birlikte, antimikrobiyal aktivite için yeni modeller olarak sülfatlanmış glikanların yeni bir araştırma materyali olması nedeniyle, henüz çok az şey bilinmektedir. Sülfatlanmış glikanların antimikrobiyal ajanlar olarak kullanımına ilişkin farmakokinetik ve biyoyararlanım özellikleri ile ilgili güncel araştırmalar, bu alanda önemli bir potansiyele işaret etmektedir. Tezimiz, biyoyumluluğu, antiinflamatuvar, kondroprotektif ve fizikokimyasal karakteristikleri ticari formlara göre avantajlı olan (Erenler ve diğ, 2022; Erenler ve diğ, 2019; Erenler, 2019) mikrobiyal kondroitin sülfatın üretimini ve antifungal etkisinin, ticari KS ile karşılaştırmalı olarak tartışılmasını amaçlamaktadır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda besiyeri hazırlanması ve bakteri stoklarının korunması için; pepton, NaCl, maya özütü (yeast ekstratı), agar, amfisilin ve sütlü besiyeri kullanılmıştır. Mikrodilüsyon yöntemiyle yapılan Antifungal aktivitede hücre canlılığının belirlenmesinde Resazurin sodyum salt (Cas no:62758-13-8, Sigma-aldrich) kullanılmıştır. Mikrobiyal kondroitin saflaştırma aşamasında; saf etil alkol, Tris, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, DNase ve Protease K kullanılmıştır. Selüloz membranı aktive etmek için; sodyum sülfür ve sülfürik asit; Mikrobiyal kondroitinin sülfatlanması aşamasında ise, DMF (Dimetil Formamid), Sülfür trioxide-pyridine, NaCl, aseton, NaOH, HCl kimyasalları kullanılmıştır.

### 2.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmamızda kullandığımız cihazlar Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.1:** Kullanılan cihazlar

| <b>Cihaz</b>                   | <b>Model-Marka</b>                  |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| Etüv                           | ES 252- NÜVE                        |
| Otoklav                        | OT 90 L- NÜVE                       |
| Hassas Terazı                  | AS220 R2- RADVAG                    |
| pH metre                       | STARTER 3100- OHAUS                 |
| Isıtıcılı manyetik karıştırıcı | Stirrer MSH-300İ -Biosan Htelli     |
| Vorteks                        | REAX TOP- HEİDOLPH                  |
| Santrifüj cihazı               | UNİVERSAL 320 R Hettich ZENTRİFUGEN |
| Liyafilizatör                  | EDWARDS                             |
| Benmari (Su banyosu)           | ST30 – NÜVE                         |
| Spektrofotometre               | Optimum-One - CHEBIOS s.r.l.        |

### 2.3 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar ve Saklama Koşulları

Çalışmamızda, Kondroitin ve Mikrobiyal KS üretimini sağlamak için *E. coli* C2987 suşu, NEB'den (New England Biolabs) satın alınmıştır. Önceki çalışmalarımızda ekibimizce bu suşa kapsüler kondroitin sentezinden sorumlu *kfoA*, *kfoC*, *kfoF* genlerinin *Vitreoscilla* hemoglobin geni olan *vgb* ile ortak ifade edildiği pETM6-PACF ve pUC8:15 plazmidi transforme edilmiştir (Erenler ve diğ., 2019; Erenler, 2019). Buradaki plazmid pETM6-PACF, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY, Mattheos Koffas'tan elde edilmişken; pUC8:15 plazmidi ise *Enterobacter aerogenes* (NRRL (ARS Culture Collection) B-427) bakterisinin *vgb*<sup>+</sup> rekombinantı olan *E. aerogenes* (pUC8:15)'ten elde edilmiştir. Kullanılan rekombinant suşların 30 günde bir LB-amp plaklarına ekimi yapılarak gece boyu üremeleri sağlanmış ve ertesi gün parafilmle plakların etrafı sarılarak +4 °C'de saklanmıştır. Deneyler süresince bu stoklar kullanılmıştır.

Mikrobiyal KS'nin antifungal etkinliğinin belirlenmesi için kullanılan mikroorganizmalar Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den alınmıştır (Çizelge 2.2). Saboraud Dekstroz Agara subkültürü yapılarak 48 saat boyunca 36 °C'de inkübe edilerek üretilmiştir. Daha sonrasında 4 °C'de taze pasaj olarak muhafazası sağlanmıştır.

**Çizelge 2.2:** MKS'nin antifungal etkinliği için kullanılan Mikroorganizma türleri

| Mikroorganizma türleri      | ATCC kimlik numaraları |
|-----------------------------|------------------------|
| <i>Candida albicans</i>     | ATCC 14053             |
| <i>Candida tropicalis</i>   | ATCC 13803             |
| <i>Candida parapsilosis</i> | ATCC 22019             |
| <i>Candida glabrata</i>     | ATCC 90030             |
| <i>Candida krusei</i>       | ATCC 14243             |

### 2.4 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Çalışmamızda bakterilerin büyümesi için temel bir besiyeri olan Lauria Broth (LB)-amp sıvı besiyeri kullanılmıştır. Besiyerleri 2'şer litrelik erlenlerde hazırlanıp 20 dakika boyunca 120 °C'de ve 1 atm basınçta otoklav edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığına

gelmesi beklenen besiyerlerine Litrede 80 mg oranında ampicillin eklenmiştir. LB besiyerinin içeriği Çizelge 2.3’de verilmiştir.

**Çizelge 2.3:** LB besiyeri (g/L)

| <b>Madde</b>                | <b>Miktar</b> |
|-----------------------------|---------------|
| Pepton                      | 10 g          |
| NaCl                        | 10 g          |
| Maya özütü (Yeast ekstratı) | 5 g           |
| pH                          | 7.5           |

\* Katı LB besiyeri için ortama % 1,5 agar ilavesi yapılmaktadır.

Mikrobiyal kondroitin sülfatın antifungal aktivitesi için Muller Hinton Agar (MHA), Muller Hinton Broth (MHB), Saboraud Dekstroz Agar, Saboraud Dekstroz Broth besiyerleri kullanılmıştır.

## 2.5 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

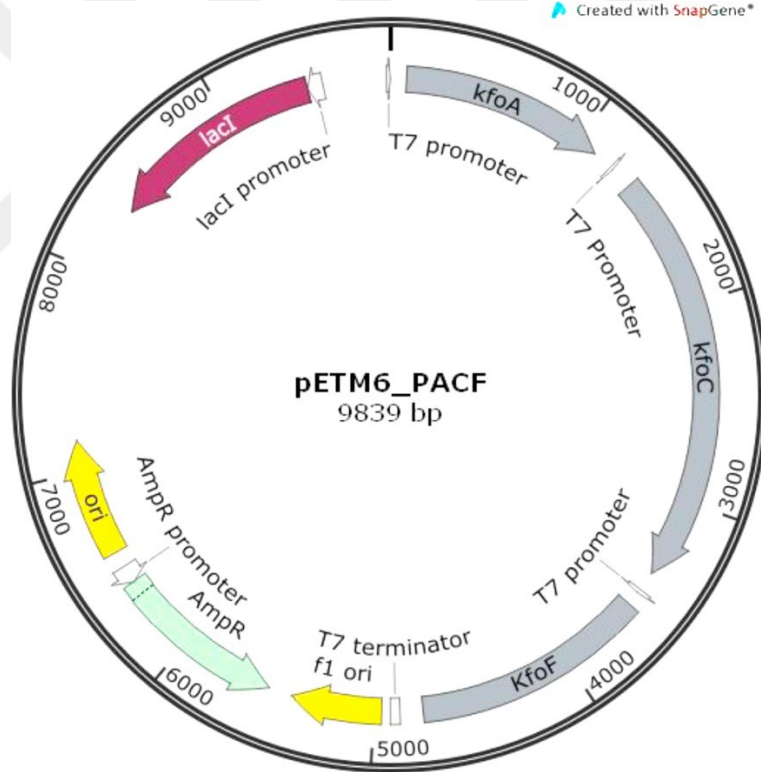
Kondroitin saflaştırma protokolü için kullanılan parçalama tamponu Çizelge 2.4 ‘de verilmiştir.

**Çizelge 2.4:** Kondroitin saflaştırma protokolü için kullanılan parçalama tamponu

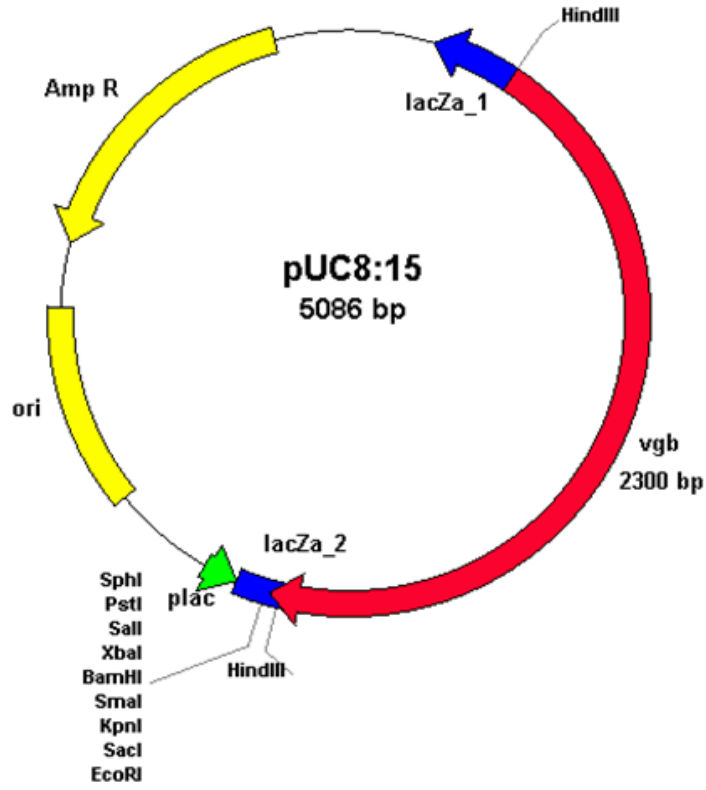
| <b>Kimyasal Madde</b> | <b>Miktar</b> |
|-----------------------|---------------|
| Tris                  | 100 mM        |
| MgCl <sub>2</sub>     | 50 mM         |
| CaCl <sub>2</sub>     | 10 mM         |
| pH                    | 7.5           |

## 2.6 Rekombinant *E. coli* pETM6-PACF-*vgb* Suşunun Oluşturulması

*E. coli* C2987 suşuna transforme edilen yeni vektörün yapımında kullanılan pETM6-PACF plazmidi, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY'dan Mattheos Koffas'dan temin edilmiştir. pUC8:15 plazmidi ise, *E. aerogenes* (NRRL (ARS Culture Collection) B-427) [pUC8:15] suşundan izole edilmiştir. Öncelikli olarak, kondroitin sentezini sağlayan gen bölgesini ve *Vitreoscilla* hemoglobin proteininin sentezini sağlayan *vgb* gen bölgesinin her ikisini de taşıyan ve kondroitin sülfat üretimi için kullanacağımız yeni rekombinant bakterinin oluşturulması için yeni bir plazmid yapımı gerçekleştirilmiştir. pETM6-PACF plazmidi, üzerinde kondroitin sentez genleri olan; *kfoA*, *kfoC* ve *kfoF*'yi taşımaktadır ve genetik haritası Şekil 2.1'de gösterilmiştir (He ve diğ, 2015). Aynı zamanda, *vgb* gen bölgesini taşıyan pUC 8:15 plazmidin genetik haritası ise Şekil 2.2'de gösterilmiştir (Kurt ve diğ, 2009).



Şekil 2.1: *kfoA*, *kfoC* ve *kfoF* geni taşıyan pETM6-PACF plazmidi (He ve diğ, 2015)



**Şekil 2.2:** *vgb* geni taşıyan pUC 8:15 plazmidini (Kurt ve diğ, 2009)

Gerçekleştirilen protokolde, *vgb* ve *kfo* olmak üzere, iki gen grubunu da taşıyan hibrit plazmid oluşturulmuştur. pETM6-PACF ve pUC8:15 plazmidlerine ait harita ve sekans bilgileri için Yeni Nesil Sekanslama (De novo NextGen) yapılmıştır. pUC8:15 vektöründen *vgb* gen bölgesi, pETM6-PACF vektöründe T7 terminatörden önceki SpeI bölgesine klonlaması yapılmıştır. Daha sonrasında, genler PCR ile çoğaltılmış ve jel ekstraksiyonu kiti ile jelden izole edilmiştir. Klonlama için jelden izole edilen DNA'lar ve pETM6-PACF vektörü SpeI enzimi kullanılarak kesilmiş ve enzim kesiminde; hedef gen 250 ng, vektör 1000 ng olarak ayarlanıp alınmıştır. Kesim işlemi için hazırlanan mix ile DNA'lar bir gece 37 °C'de inkübe edilmiş ve enzim kesimi yapılmıştır. Daha sonrasında, kesimi yapılan hedef gen (0,5 µl) ile kesilmiş vektörün (pETM6-PACF- 1,5 µl) ligasyon işlemi ortama 15,5 µl su, 2 µl 10X LigBuf ve 0,5 µl T4 Enzim de ilave edilerek hazırlanmış ve 22 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır (Ülke, 2019).

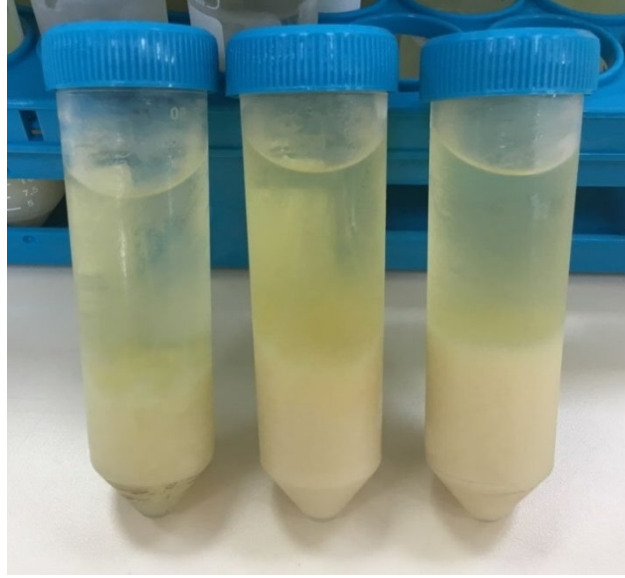
Ligasyon işleminden sonra oluşturulmuş plazmidin *E. coli*'ye transformasyonu gerçekleştirilmiştir. 10 µl ligasyon ürünü, *E. coli* üzerine eklenerek hafifçe karıştırılmış ve daha sonra 15 dakika buz üzerinde inkübasyon yapılmıştır. Bu aşamada plazmid DNA'sının hücreye yapışması sağlanmış ve buz üzerinde inkübasyonu yapılan bakterilerin

porlarının açılıp, DNA'nın bakteri içerisine girmesi için örnekler 42 °C'de 1 dakika bekletilmiştir. Porların kapanması için ise 1 dakika sonunda örnekler buza alınmıştır. Bakteri ve ligasyon örnekleri, ependorf tüpüne alınmış ve 37 °C'de 20-30 dakika çalkalayıcıda karıştırılarak, daha sonra örnekler amp (+) olan LB agarlı petrilere ekilmiş ve 1 gece 37 °C'de inkübe edilmiştir. Sonuç olarak, kondroitinin mikrobiyal üretimini sağlayacak olan rekombinant *E. coli* suşu elde edilmiştir.

## 2.7 Mikrobiyal Kondroitinin Üretimi

Kondroitin sentezinden sorumlu *kfoA*, *kfoC*, *kfoF* genlerini ve *Vitreoscilla* hemoglobin genini (*vgb*) taşıyan pETM6-PACF-pUC8:15 plazmidinin transforme edilmesiyle oluşturulan rekombinant *E. coli* suşu ile kondroitin sentez işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın saflaştırma aşamasında pETM6-PACF plazmidinin kullanıldığı çalışmadaki yöntem takip edilmiştir (Shi ve diğ, 2014). Yöntem, sıvı LB-amp besiyerlerinde üretilen bakteri biyokütlesinin toplanmasıyla başlayarak birkaç çökeltme aşamasına ve son olarak liyofilizatörde kurutmaya dayanmaktadır.

Oluşturulan rekombinant *E. coli* suşu 2 litrelik erlenlerde hazırlanan LB-amp sıvı besiyerine ekimi yapılarak 48 saat boyunca 36 °C'de 140 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. 48 saat sonrasında, gece kültürü santrifüj tüplerine aktararak 9000 rpm de 5 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüpleri içerisindeki pelletler biriktirilerek yeniden distile suda süspanse edilip (yaklaşık 20-30 mL) tek bir santrifüj tüpünde toplanmıştır. Daha sonra bu tüp 15 dakika sıvı döngüsünde otoklav edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş ve 9000 rpm de 10 dak. santrifüj edilmiştir. Süpernatant iki farklı falkon tüpüne aktarılmış ve üzeri toplam hacim 45 mL olacak şekilde +4 °C'de soğutulmuş alkolle tamamlanmıştır. Alkol ilavesinin ardından örnek alt üst edilerek alkolle karışması sağlanmış ve -20 °C'lik dondurucuda bekletilerek çökeltme işlemi sürdürülmüştür (Şekil 2.3).



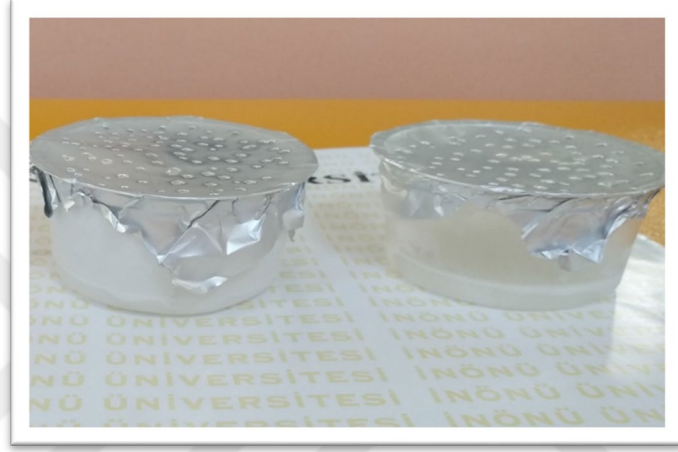
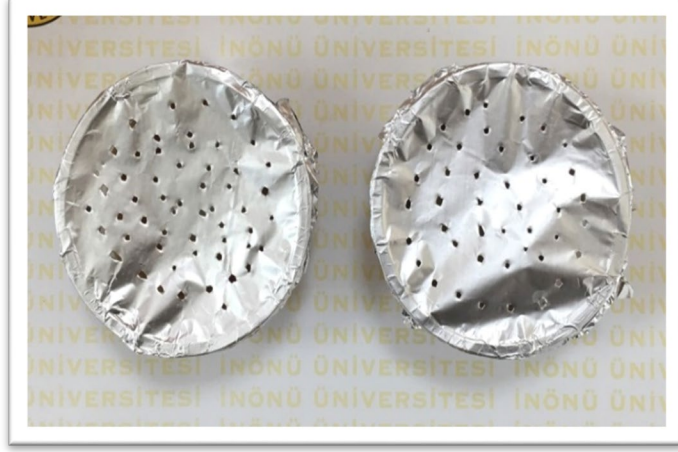
**Şekil 2.3:** Santrifüj tüpleri içerisindeki üzeri soğuk alkolle tamamlanmış süpernatantların -20 °C'ye konulmadan önceki resimleri

Geceboyu bekleyen numune 9000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, elde edilen peletler toplanmış ve pH 7.5 olarak ayarlanmış parçalama tamponunda yeniden süspansiyon edilmiştir. Tüp içinde kalan pelet üzerine parçalama tamponu eklenerek vortexlenip karıştırılmıştır.

Parçalama tamponu: 1000 mL için,

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Tris              | 12.1 g |
| MgCl <sub>2</sub> | 4.76 g |
| CaCl <sub>2</sub> | 1.1 g  |

Numunelerin üzerine DNase eklenmiş (1 mg/L) ve örnek 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Örneklerin üzerine Protease K eklenmiş (2,5 mg/mL) ve 56°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Toplam hacim 45 mL olacak şekilde örneğin üzerine soğuk (+4 °C) alkol eklenmiştir. Örnekler 9000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek supernatant atılmıştır. Kalan pelet santrifüj tüpünün içerisinde 15 mL'ye kadar distile su ile tamamlanıp vortexle çözülmüştür. 15 mL olan son hacmin hepsi tek bir spin kolon plastik kabı içerisine dökülmüştür. Üzeri alüminyum folyo ile kapatılıp delikler açılarak spin kolonda -20 °C'de dondurularak filtreleme için hazır hale getirilmiştir. Filtrelemeden sonra geriye kalan kısım vakumla liyofilize edilmiştir (Şekil 2.4 ve Şekil 2.5).



**Şekil 2.4:** Yukarıdaki işlemlerle elde edilen kondroitinin spin kolon plastik kabı içerisindeki görüntüsü

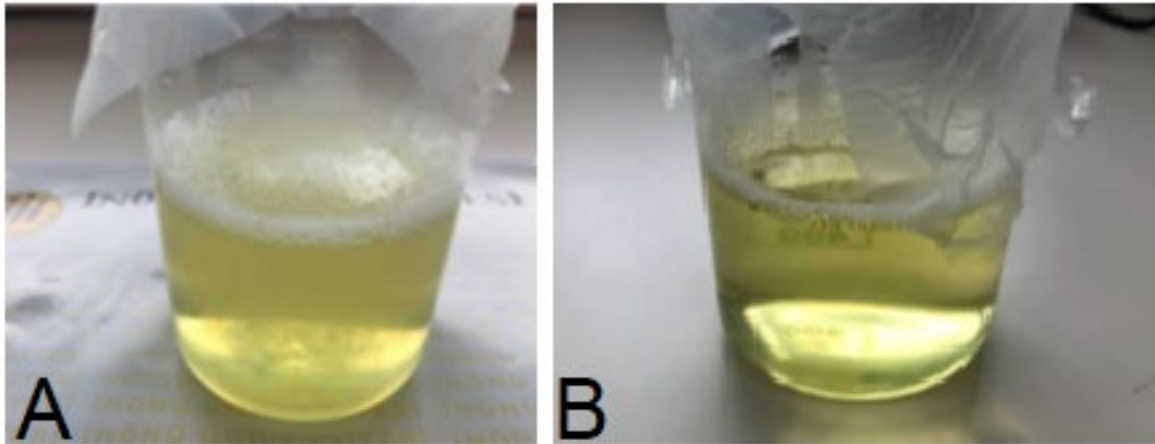


**Şekil 2.5:** Liyafilizatörde vakumla kurutulmuş Mikrobiyal Kondrotin

## 2.8 Mikrobiyal Kondroitinin Sülfatlama Aşaması

Önceki aşamada elde edilen mikrobiyal kondroitine sülfatlama işlemi yapılmıştır (Shi ve diğ., 2014). Ticari KS'lerde, GalNAc tortularının neredeyse tamamı 4 ya da 6 konumunda sülfatlandığı ve 6-pozisyonunda sülfat oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yaptığımız işlem ile tüm GalNAc tortularının 6. pozisyonundaki hidroksil gruplarının sülfatlanıp, uygun bir şekilde 4. pozisyonundaki hidroksil tortularını koruyan bir polimer elde edilmesi amaçlanmıştır.

Kondroitin sülfatlama işlemi için, mevcut mikrobiyal kondroitinin 4 gramı 80 mL sulu DMF (Dimetil formamid) içinde çözülmüş ve solüsyon 0-5 °C'ye kadar soğutulmuştur. Daha sonra soğutulmuş solüsyona 12 g Sülfür trioxide-pyridine complex eklenmiştir. Solüsyonun oda sıcaklığına ulaşması beklenmiş ve 400 mL NaCl'e doymuş aseton ilave ederek çöktürme işlemi yapılmıştır. Çökeltinin üzerinde kalan doymuş aseton pipetle çekilerek geri kalan çökelti spin kolonlara boşaltılmıştır. Daha sonra liyofilizatörde kurutulması sağlanmıştır. Kurutma işleminin ardından toplamda elde edilen katı miktar 200 mL'de iyonize suda çözülüp elde edilen çözelti 1 N NaOH ile nötralize edilmiştir. Nötralizasyon sağlandıktan sonra çözelti 40 °C'ye kadar ısıtılmış 0,2-0,3 N 60 mL NaOH ile çözülmesi sağlanmıştır. Bu sıcaklıkta 2 saat tutulmuş ve daha sonra oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş ve daha sonra HCl asit damlatılarak nötralize edilmiştir (Şekil 2.6.).



**Şekil 2.6:** A: NaOH ile 2 saat muameleden sonraki hali; B: HCl damlattıktan sonraki hali

Çözelti 10 µs'den küçük geçirgenlik iletkenliğe sahip zar (membran) aracılığıyla filtrelenmiştir. Öncelikli olarak membran aşağıdaki protokolle (Başlık 2.9) aktive edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Son olarak çözelti spin kolonlara 15'er mL'ye bölünüp liyofilize edilerek kurutulmuştur (Şekil 2.7). Elde edilen KS numunelerine Nükleer

Manyetik Rezonans (NMR) ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile doğrulama analizleri yapılmıştır.



**Şekil 2.7:** Liyofilizatörde vakum ile kurutulan Mikrobiyal Kondroitin Sülfat

## 2.9 Membran Aktivasyonu

Membrandaki nemlendirici olarak kullanılan gliserolün fazlasının giderilmesi için membran, akan suyun altında yıkayıp distile su içinde 1 gece bekletilerek ertesi gün tekrar yıkayıp bir kaç kez suyu değiştirilmiştir. Kükürt bileşiklerinin uzaklaşması için membran 1 dakika boyunca 80 °C de % 0,3 (a/h) sodyum sülfür solüsyonuyla muamele edilmiştir. Membran, 60 °C de distile suda 2 dakika boyunca yıkanmış, bunu takiben % 0,2'lik (h/h) sülfürik asit ile muamele edilmiştir. Daha sonra asit uzaklaştırmak için membran sıcak su içerisinde durulanmıştır.

## 2.10 Mikrobiyal KS'nin NMR Analizleri

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi, karbonhidratların yapısını aydınlatmak için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. GAG-protein komplekslerini araştırmak için en yaygın kullanılan kapsamlı analitik yöntemlerden biridir. Ürettiğimiz KS'nin NMR analizi, İBTAM (İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi) bünyesinde yapılmıştır. Tüm NMR deneyleri, bir Bruker Avance III 600 HD spektrometre (Bruker BioSpin, Billerica, MA) üzerinde Topsin 3.1.7 yazılımı (Bruker) ile gerçekleştirilmiştir. Tek boyutlu 1H NMR spektrumları için koşullar şu şekildedir: 12.3 kHz'lik titreme alanı, 2.66 s'lik toplama süresi, 8.00 s'lik gevşeme gecikmesi, 24.8 °C sıcaklıktır.

## 2.11 Mikrobiyal KS'nin HPLC analizleri

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), bir sıvı içinde çözülebilen herhangi bir numunede bulunan bileşiklerin ayrılması, tanımlanması ve nicelendirilmesi için kullanılan kromatografik bir tekniktir. Mikrobiyal KS'nin HPLC analizleri, İBTAM (İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi) bünyesinde yapılmıştır. Tüm HPLC analizleri AGİLENT 1100 series cihazında gerçekleştirilmiştir. Ölçümler “D-7000 HPLC-System-Manager 4.0” software kullanılarak yapılmıştır.

## 2.12 Mikrobiyal KS'nin Antifungal Aktivitesinin Belirlenmesi

### 2.12.1 Antifungal aktivitenin agar dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmesi

Ön çalışma olarak, Mikrobiyal KS'nin *Candida albicans*'a karşı antifungal aktivitesi, agar seyreltme prosedürü kullanılarak belirlenmiştir. Agar seyreltme yöntemi, Muller Hinton agar ortamına farklı Mikrobiyal KS konsantrasyonları eklenerek gerçekleştirilmiştir. 7.5 mL Muller Hinton agar'a %48, %40, %32, %24, %16, %8 ve %4 olmak üzere yedi farklı konsantrasyon elde etmek için sırasıyla 3.6, 3.0, 2.4, 1.8, 1.2, 0.6 ve 0.3 g (a/h) Mikrobiyal KS eklenmiştir. Daha sonrasında, *C. albicans*'ın Muller Hinton Agar'a subkültürü yapılmıştır. Direkt koloni süspansiyonu distile suda yapılmış ve bulanıklık 0,5 McFarland standardına ( $1 \times 10^6$  cfu/mL) ayarlanmıştır. Farklı Mikrobiyal KS konsantrasyonları eklenmiş agar plakalarının yüzeyine maya hücrelerinin standart inokulumdan bir öze dolusu (10 µl) ekim yapılmıştır. Üreme, iki gün (48 saat) boyunca 37°C'de inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir (Şekil 3.5).

Agar dilüsyon yönteminin detaylı çalışmasında, Mikrobiyal KS'nin ve ticari KS'nin karşılaştırmalı olarak *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* olmak üzere 5 farklı mantar türü üzerindeki antifungal aktivitesi test edilmiştir. 6 mL'lik Muller Hinton agar plaklarına sırasıyla % 48, %42, % 36, % 30, % 24, % 18, % 12, % 6, % 3, % 1, % 0.5 konsantrasyonları elde etmek için sırasıyla 2.88, 2.52, 2.16, 1.80, 1.44, 1.08, 0.72, 0.36, 0.18, 0.06, 0.03 g (a/h) Mikrobiyal KS eklenmiştir. Kontrol plağına Mikrobiyal KS eklenmeyerek saf Muller Hinton Agar koyulmuştur. Her bir *Candida* türü için direkt koloni süspansiyonu distile suda yapılmış ve bulanıklıkları 0,5 McFarland standardına ( $1 \times 10^6$  cfu/mL) ayarlanmıştır. Sonrasında, agar plaklar 5 farklı bölgeye bölünerek 5 tekrarla *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* olmak üzere farklı *Candida* türünün inokülasyonu yapılmıştır. Farklı Mikrobiyal KS konsantrasyonları

eklenmiş agar plakalarının yüzeyine maya hücrelerinin standart inokulumdan mikropipetle 2'şer µl inoküle edilmiştir. Plaklar iki gün (48 saat) boyunca 37°C'de etüvde inkübasyona bırakılmış, sonrasında *Candida* türlerinin plaklar üzerindeki üremesi değerlendirilmiştir. Aynı protokol ticari KS için de tekrarlanmıştır.

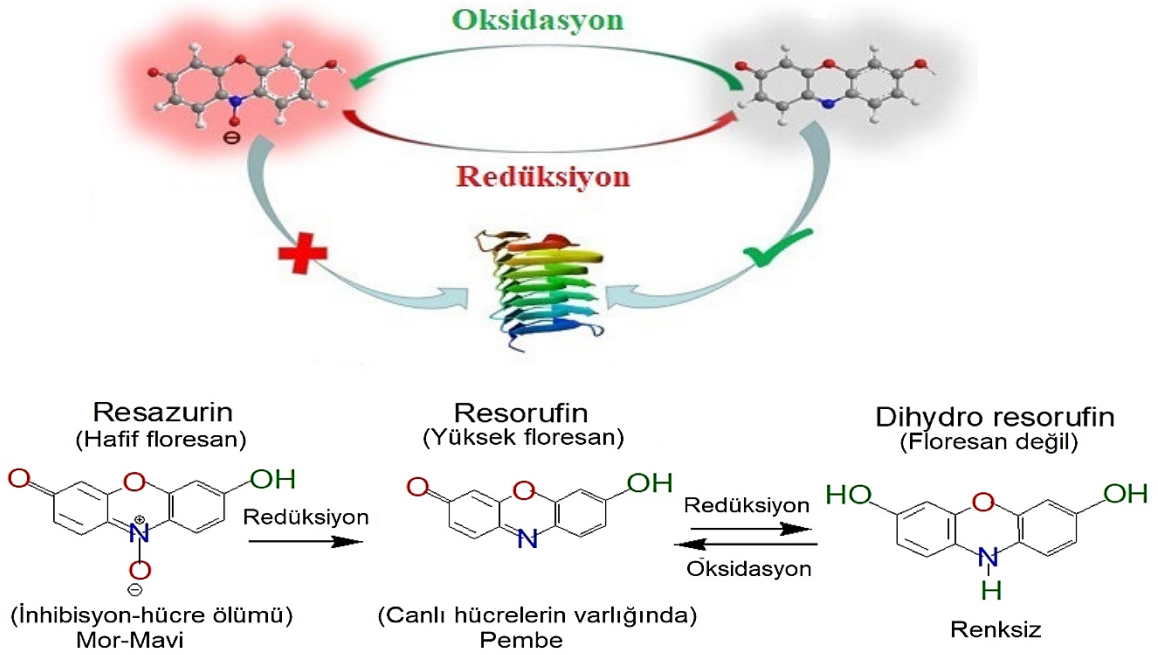
### **2.12.2 Antifungal aktivitenin broth dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmesi**

Antifungal aktivitenin tayini için Broth Mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Broth Mikrodilüsyon yönteminde Mikrobiyal KS ve ticari KS karşılaştırmalı olarak yine *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* olmak üzere 5 farklı mantar türü üzerindeki antifungal aktivitesi test edilmiştir. Bunun için 96 kuyucuklu mikropalak kullanılmıştır. Her kuyucuğa 200 µl Muller Hinton broth besiyeri içerisine sırasıyla % 48, %42, % 36, % 30, % 24, % 18, % 12, % 6, % 3, % 1 konsantrasyonları elde etmek için sırasıyla 96, 84, 72, 60, 48, 36, 24, 12, 6, 2 mg (a/h) Mikrobiyal KS eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarının birine Mikrobiyal KS eklenmeyerek saf Muller Hinton Broth; diğerine Muller Hinton Broth ile beraber kullanılan mantar türü karışımı koyulmuştur. Aynı işlemler farklı bir mikropalakta ticari KS için de tekrarlanmıştır. Her bir *Candida* türü için direkt koloni süspansiyonu distile suda yapılmış ve bulanıklıkları 0,5 McFarland standardına ( $1 \times 10^6$  cfu/mL) ayarlanmıştır. Sonrasında, mikropalalara *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei*' nin 10'ar µl inokülasyonları yapılmıştır. Farklı KS konsantrasyonları bulunan mikropalaklar iki gün (48 saat) boyunca 37°C'de etüvde inkübasyona bırakılmış, sonrasında her bir kuyucuğa % 0.15 oranında hazırladığımız Resazurin'den 15 µl eklenmiştir. Mikropalaklar 3-4 saat 37°C'de etüvde bekletilmiş ve renk değişikliği gözlenerek *Candida* türlerinin üremesi değerlendirilmiştir.

#### **2.12.2.1 Resazurin**

Resazurin, hücre içine giren, toksik olmayan, floresan mavi indikatör ve fenoksazin-3- on yapısında bir boyadır. Resazurinin hücre canlılığını gösterdiği yöntem aynı zamanda "resazurin redüksiyon yöntemi" olarak adlandırılır. Resazurin kantitatif olarak insan, hayvan, mantar, bakteri ve mikobakterilerde hücre proliferasyonunun belirlenmesi için kullanılır. Resazurin hücre metabolik aktivite ile metabolik redüksiyona uğrayan bir redoks indikatörüdür. Redükte formu rezorufin olarak adlandırılır ve pembe renkli ve yüksek derecede floresan özellikli bir bileşiktir. Resazurin canlı ve oksidatif fosforilasyon (solunum) yapabilen hücrelerde mitokondriyel enzimler ve bazı diğer enzimlerle (örneğin, diaforaz) rezorufine dönüştürülür. Dolayısıyla, oluşan floresansın miktarı canlı ve solunum

yapabilen hücre sayısı ile doğru orantılıdır (Şekil 2.8.) (Erkekoğlu ve Baydar, 2021; Sundara Selvam ve diğ., 2020).



**Şekil 2.8:** Resazurin ve Resorufin ve Dihydro resorufinin kimyasal yapıları (Sundara Selvam ve diğ., 2020; Wang ve diğ., 2019)

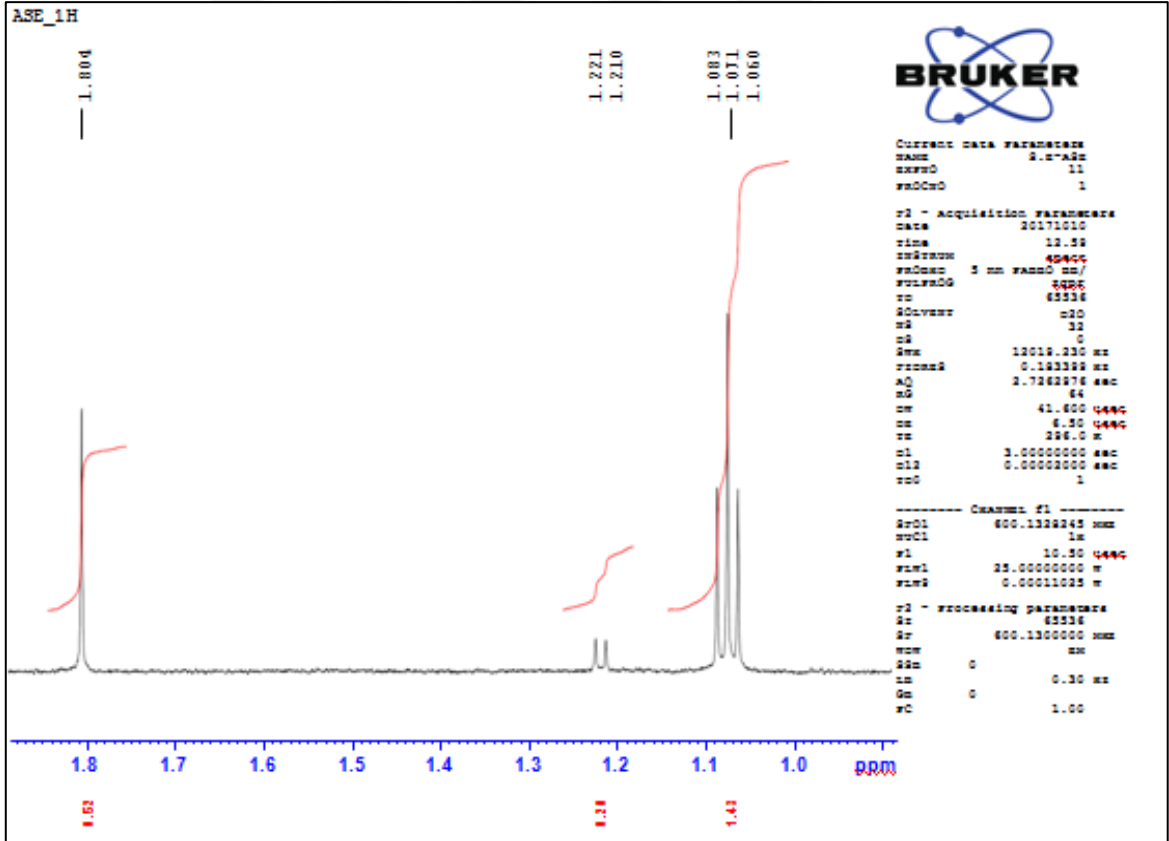
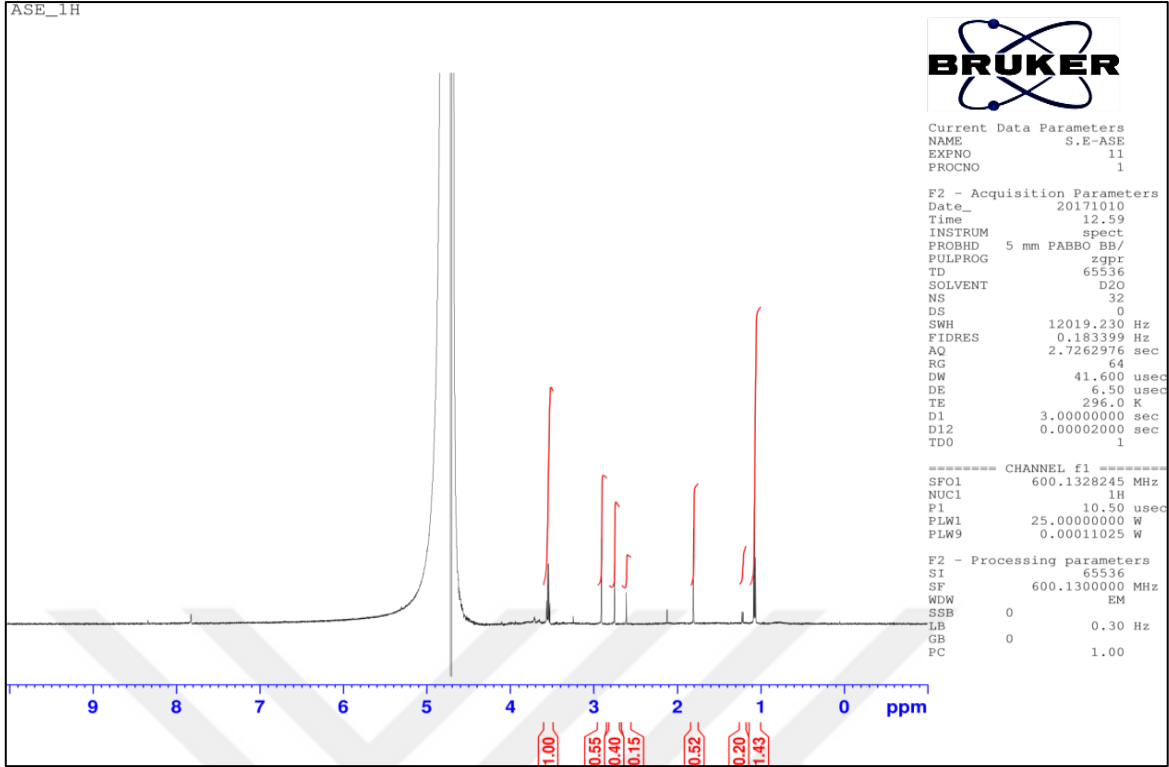
### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1 Mikrobiyal KS'nin NMR Analiz Sonuçları

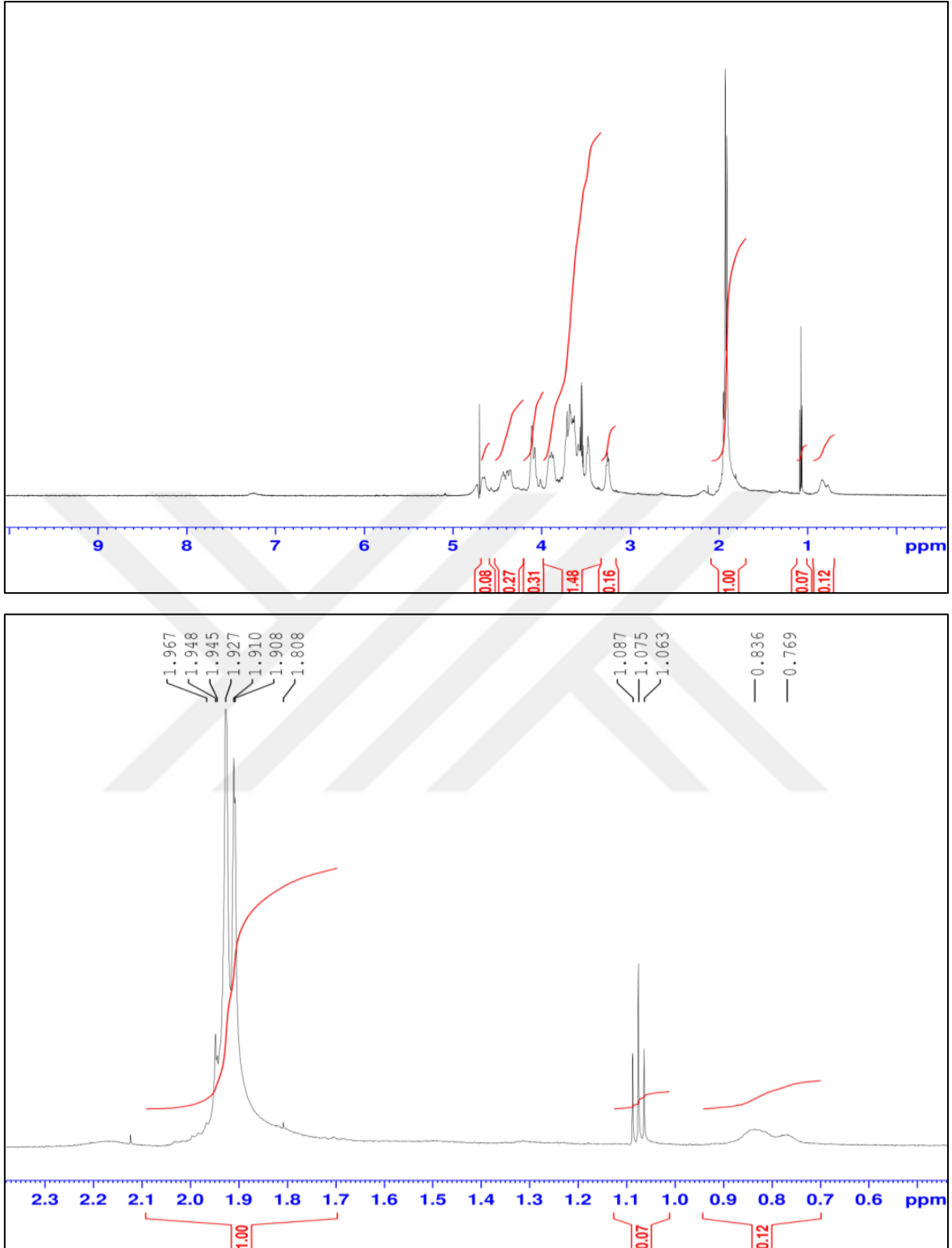
Doğal ürünlerdeki KS, C-4 konumunda sülfat grubu yalnız başına bulunmayıp C-6 konumundaki sülfat grubuna birleşik halde bulunmaktadır. Genellikle ticari kaynaklı bir KS, % 40 oranında C-4 konumunda, % 60 oranında ise C-6 konumunda sülfat grubu içermektedir. Çalışmamızda ticari KS'ye özdeş nitelikte, 6-konumunda sülfat deseni oluşturulmuştur.

NMR analizi, İBTAM (İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi) bünyesinde yapılmış olup NMR sonuçları aşağıda verilmiştir (Şekil 3.1.). Elde ettiğimiz KS'nin Kondroitinaz ABC enzimi ile muamele edilmesi sonucu yapısında bulunan disakkarit birimleri serbest hale geçerek yan yana iki spektrum vermiştir. Bunlar; sülfatladığımız *N*-asetil- $\beta$ -galaktozamin-6-sülfat ve sülfatlanmamış Poli [ $\beta$ -glukuronik asit] birimleridir. Ticari KS'nin enzim ile parçalanması sonucu ise açığa çıkan 4-S ve 6-S birimleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.2.). Elde ettiğimiz KS'nin verdiği NMR spektrumlarının, referans ticari KS ve literatürdeki diğer kaynaklardan elde edilen KS nin NMR spektrumları ile eşleştiği rapor edilmiştir (Ülke, 2019).

Ticari KS'nin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 18.000-20.000 D. arasında belirtilmiştir. Mikrobiyal KS de ise NMR analizi sonucu moleküler ağırlığın 300-3000 D. aralığında olduğu belirtilmiştir.



Şekil 3.1: *E. coli* pETM6-PACF-*vgb*<sup>+</sup> suşundan elde edilen Mikrobiyal KS'ye ait NMR sonuçları

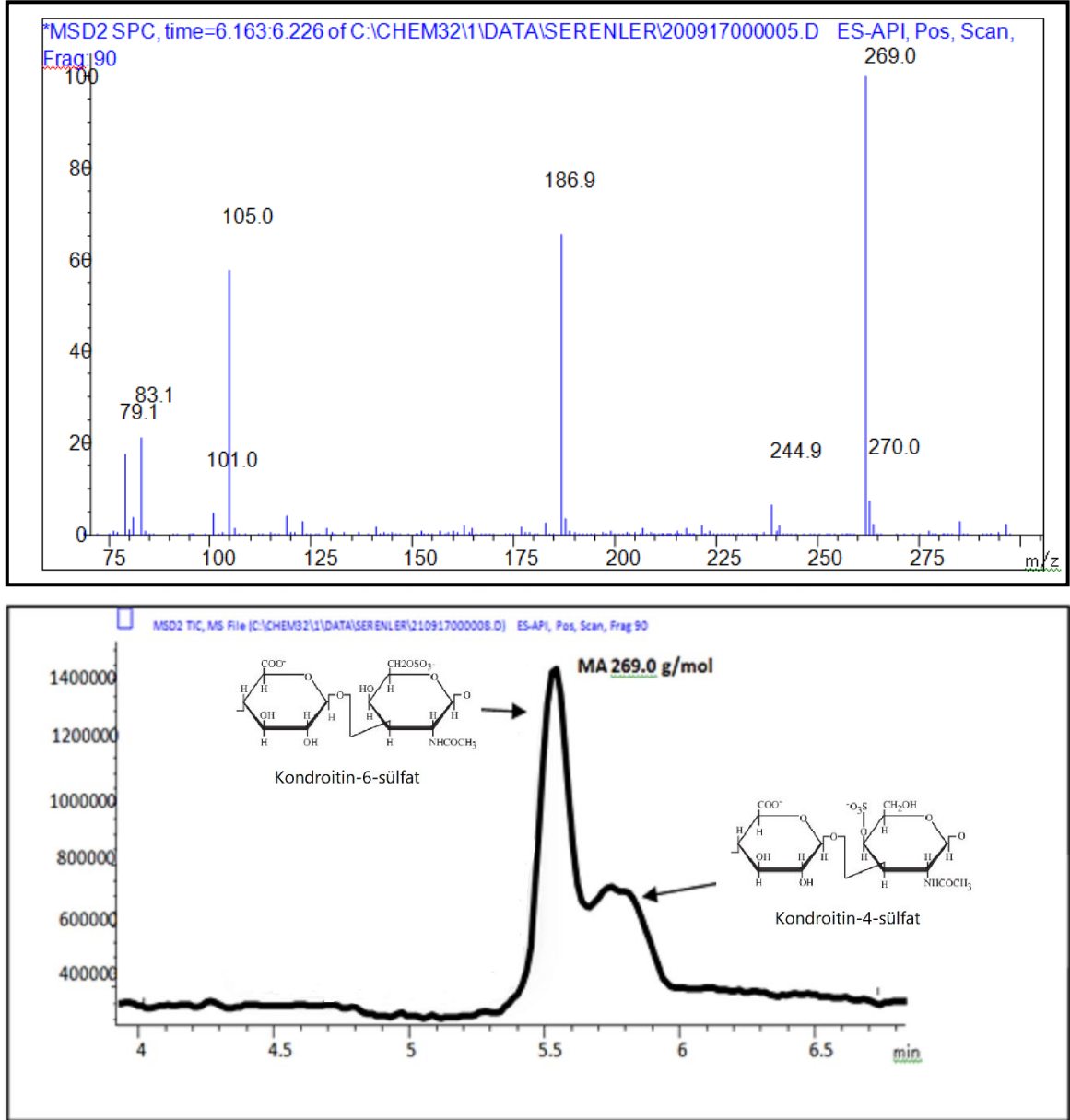


Şekil 3.2: Sığır trakesi kaynaklı kontrol ticari KS'ye ait NMR sonuçları

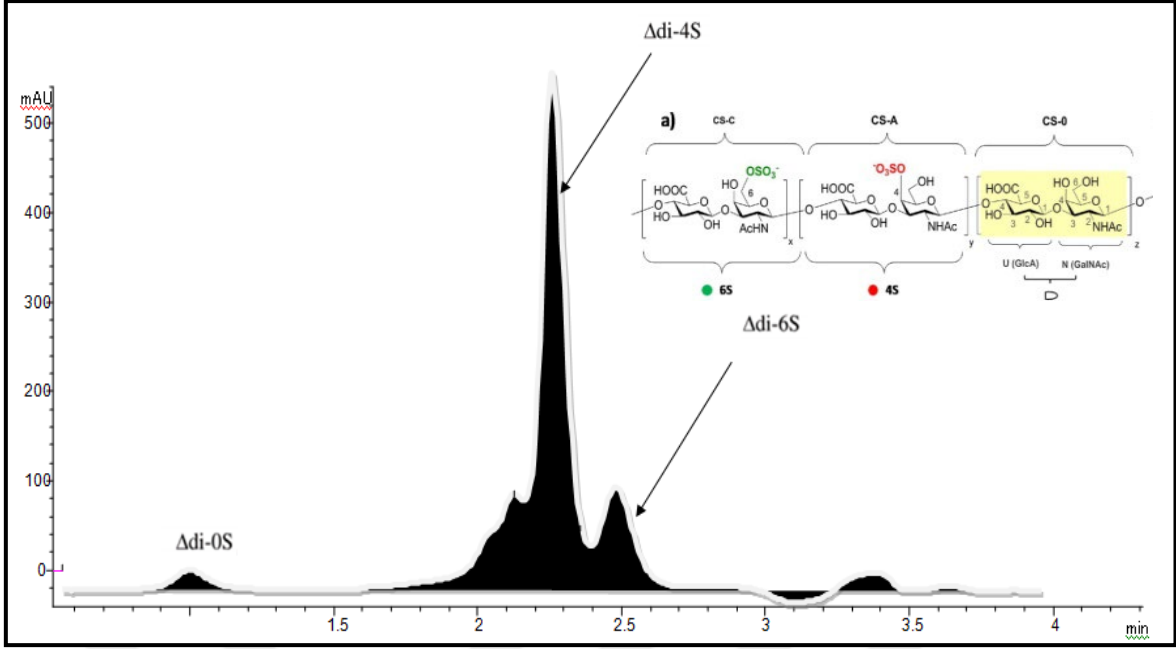
### 3.2 Mikrobiyal KS'nin HPLC Analiz Sonuçları

HPLC analizleri, İBTAM (İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi) bünyesinde yapılmış olup elde edilen HPLC sonuçları aşağıda verilmiştir (Şekil 3.3.).

Ayrıca, ürettiğimiz Mikrobiyal KS için kontrol olarak kullanmak üzere, ticari sığır trakesi kaynaklı KS'nin de HPLC analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucu Şekil 3.4.'de verilmiştir. Aynı zamanda sonuçlar, literatürdeki farklı kaynaklardan elde edilen KS'nin HPLC analizleriyle karşılaştırılarak, sonuçların uyumlu olduğu rapor edilmiştir (Ülke, 2019). Sonuç olarak HPLC analiz sonucumuza göre, ürettiğimiz Mikrobiyal KS'nin 269 dalton molekül ağırlığında olduğu tespit edilmiştir.



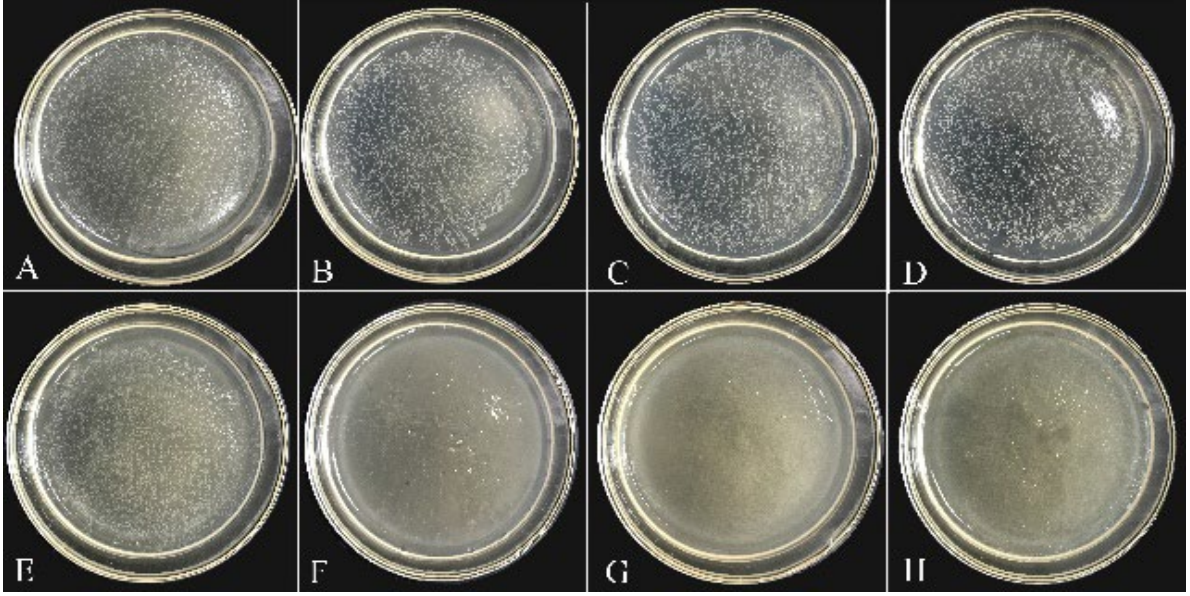
Şekil 3.3: *E. coli* pETM6-PACF-vgb<sup>+</sup> suşundan üretilen KS'nin HPLC analiz sonuçları



Şekil 3.4: Sığır trakesi kaynaklı kontrol ticari KS'ye ait HPLC analiz sonucu

### 3.3 Mikrobiyal KS'nin *C. albicans*'a karşı Antifungal Aktivite Sonuçları (Ön çalışma)

Mikrobiyal KS'nin *C. albicans*'a karşı antifungal etkinliğinin sonuçları Şekil 3.5'de gösterilmiştir. 37 °C'de iki günlük inkübasyondan sonra, kontrol grubunun petri kapları (0 g/mL), 0.04, 0.08, 0.16 ve 0.24 g/mL Mikrobiyal KS grupları tamamen beyaz *C. albicans* kolonileri ile kaplanmıştır. Ayrıca, 0.24 g/mL Mikrobiyal KS petri kaplarında gözlemlenen koloniler, kontrole kıyasla büyümelerinde bir günlük gecikme olmasına rağmen tamamen beyaz kolonilerle kaplanmıştır. İki günlük inkübasyon sonrasında 0.32, 0.4 ve 0.48 g/mL Mikrobiyal KS ile muamele edilmiş petri kaplarında hiçbir koloni tespit edilmemiştir (Şekil 3.5). Görünür büyümeyi önleyen en düşük Mikrobiyal KS konsantrasyonu, Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle Mikrobiyal KS'nin *C. albicans*'a karşı MİK değeri 0.32 g/mL olarak belirlenmiştir. Yaptığımız bu çalışma ULAKBİM tarafından taranan uluslararası bir dergide yayımlanmıştır (Unver ve diğ, 2019).

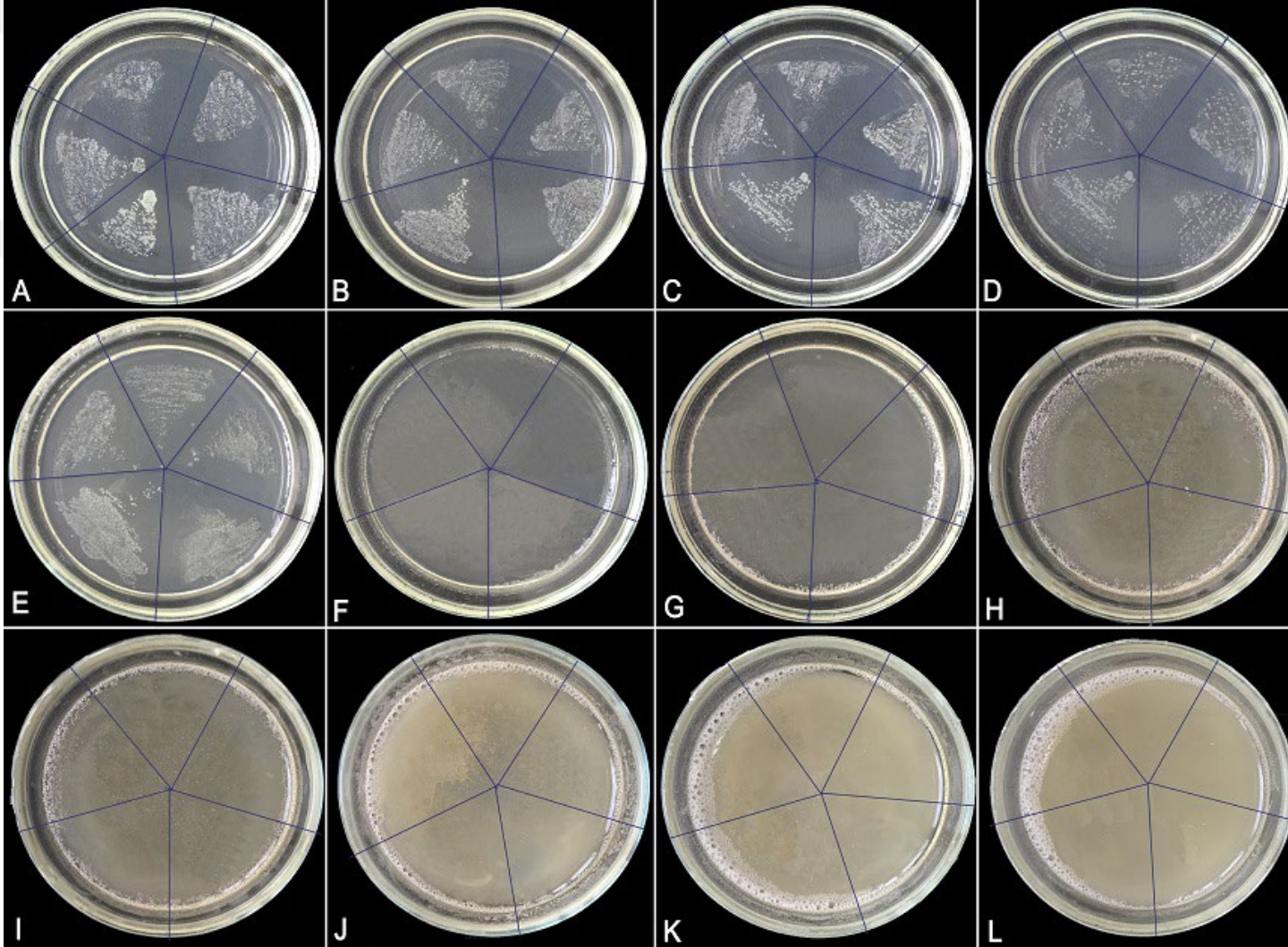


**Şekil 3.5:** Agar seyreltme yöntemi kullanılarak *C. albicans*'a karşı farklı konsantrasyonlarda (g/mL) Mikrobiyal KS antifungal aktivite test sonuçları. (A) Kontrol, (B) 0.04, (C) 0.08, (D) 0.16, (E) 0.24, (F) 0.32, (G) 0.4, (H) 0.48 g/mL.

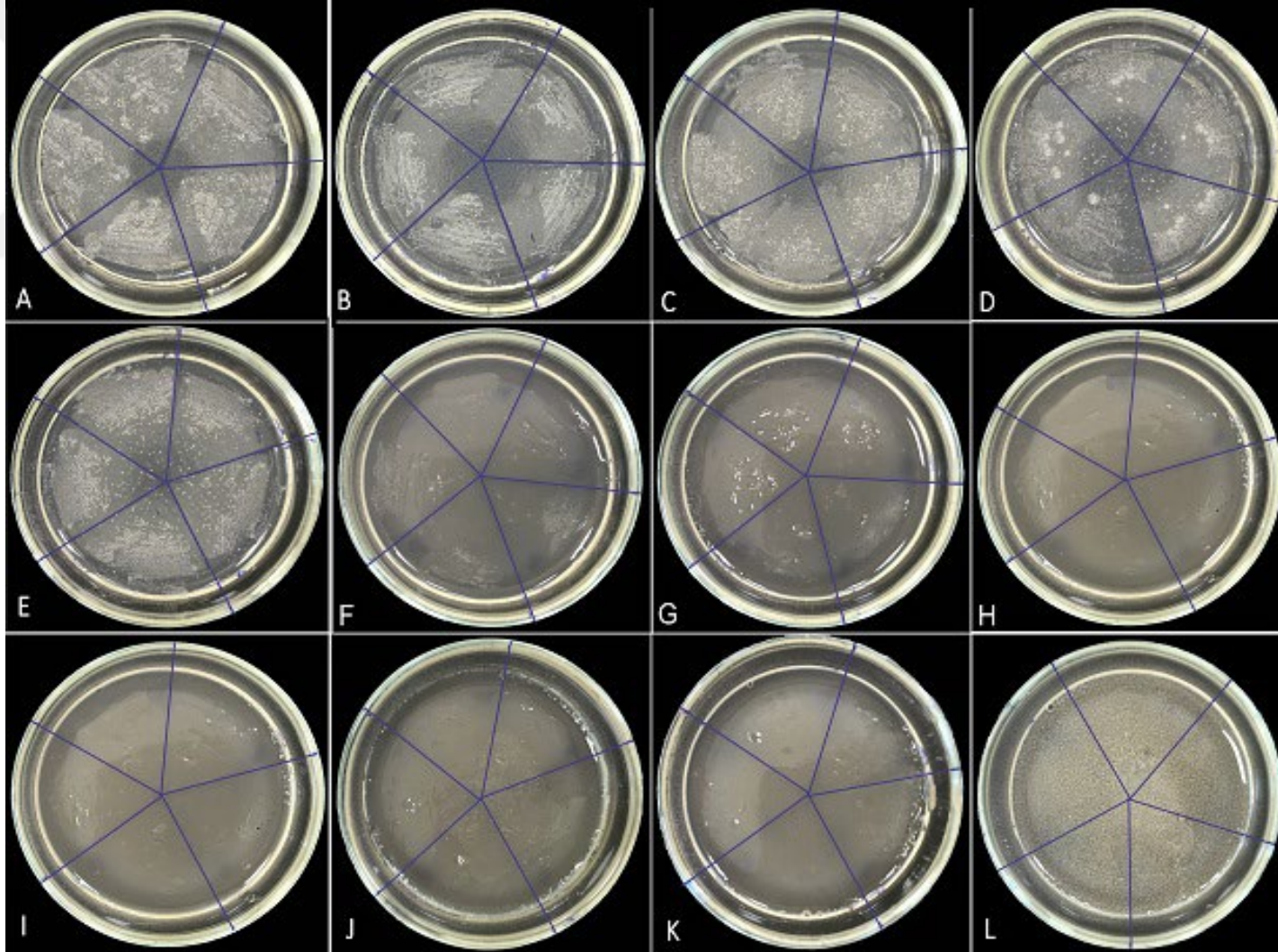
#### **3.4 Mikrobiyal KS ve Ticari KS'nin *C. albicans*'a karşı Antifungal Aktivite Sonuçları**

Agar dilüsyon yönteminin detaylı çalışmasında, Mikrobiyal KS'nin *C. albicans*'a karşı antifungal etkinliği sonuçları Şekil 3.6.'da gösterilmiştir. 37 °C'de iki günlük inkübasyondan sonra, *C. albicans* için kontrol grubunun petri kapları (0 g/mL), 0.005, 0.01, 0.03 ve 0.06 g/mL Mikrobiyal KS; sırasıyla A, B, C, D ve E plakları beyaz *C. albicans* kolonileri ile kaplanmıştır. 0.12, 0.18, 0.24, 0.3, 0.36, 0.42 ve 0.48 g/mL Mikrobiyal KS ile muamele edilmiş F, G, H, I, J, K ve L petri kaplarında hiçbir koloni tespit edilmemiştir. Dolayısıyla bu çalışmada Mikrobiyal KS'nin *C. albicans*'a karşı antifungal etkinliğinin belirgin olduğu ve MİK değerinin 0.12 g/mL olarak belirlenmiştir.

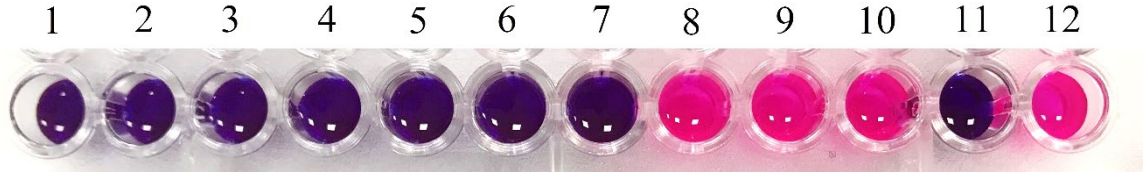
Ticari KS ile yapılan çalışmada ise, ticari KS'nin *C. albicans*'a karşı MİK değerinin daha yüksek konsantrasyon olan 0.24 g/mL olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın sonucu Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



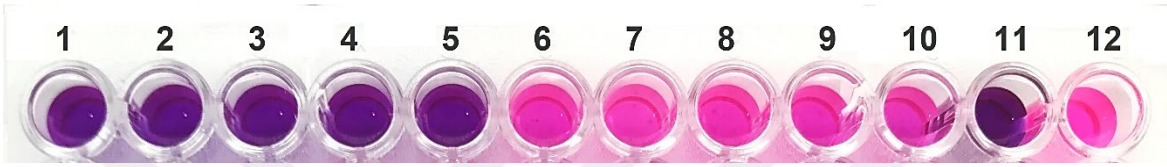
**Şekil 3.6:** Farklı konsantrasyonlardaki Mikrobiyal KS'nin *C. albicans* üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları. (A) Kontrol, (B)0.005, (C) 0.01, (D) 0.03, (E) 0.06, (F) 0.12 (MİK değeri), (G) 0.18, (H) 0.24, (I) 0.30, (J) 0.36, (K) 0.42, (L) 0.48 g/mL.



**Şekil 3.7:** Farklı konsantrasyonlardaki ticari KS'nin *C. albicans* üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları. (A) Kontrol, (B)0.005, (C) 0.01, (D) 0.03, (E) 0.06, (F) 0.12, (G) 0.18, (H) 0.24 (MİK değeri), (I) 0.30, (J) 0.36, (K) 0.42, (L) 0.48 g/mL.



**Şekil 3.8:** Mikrobiyal KS'nin *C. albicans*'a karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi. Herhangi bir renk değişikliğinin olmadığı 7. kuyucuktaki Mikrobiyal KS konsantrasyonu (%12- 0.12 g/mL) *C. albicans* için MİK değerleri olarak kabul edilmiştir. 11. Kuyucuk plak hazırlanırken herhangi bir kontaminasyonun olmadığını doğrulayan kontroldür. 12. kuyucuk *C. albicans*'ın canlılığını ifade eden kontroldür.



**Şekil 3.9:** Ticari KS'nin *C. albicans*'a karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi. Herhangi bir renk değişikliğinin olmadığı 5. kuyucuktaki Mikrobiyal KS konsantrasyonu (%24- 0.24 g/mL) *C. albicans* için MİK değerleri olarak kabul edilmiştir.

Broth Mikrodilüsyon yönteminde, hem Mikrobiyal KS'nin hem de ticari KS'nin *C. albicans*'a karşı antifungal aktivitesi tekrar edilmiştir. Mikrodilüsyon yönteminin uygulandığı mikropalak üzerindeki renk değişikliğinin görülmediği en az KS miktarının bulunduğu KS konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmektedir. Aynı mikropalaklar üzerindeki 1-10 arası kuyucuklara sırasıyla 0.48, 0.42, 0.36, 0.3, 0.24, 0.18, 0.12, 0.06, 0.03 ve 0.01 g/mL konsantrasyonlarında Mikrobiyal KS ve ticari KS eklenmiştir. 48 saatlik inkübasyondan sonra resazurin eklenmiştir. Pembe renk üremeyi göstermekte, mavi renk ise üremenin inhibisyonu anlamına gelmektedir. Bu çalışma sonucunda, Mikrobiyal KS'nin ve ticari KS'nin MİK değerleri, tüm *Candida* türleri için agar dilüsyon yöntemlerine paralel olarak belirlenmiştir. *C. albicans* için bu değer, Mikrobiyal KS'de renk değişikliğinin görülmediği 7. kuyucuktaki 0.12 g/mL iken, ticari KS'de renk değişikliğinin görülmediği 5. kuyucuktaki 0.24 g/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.8, Şekil 3.9).

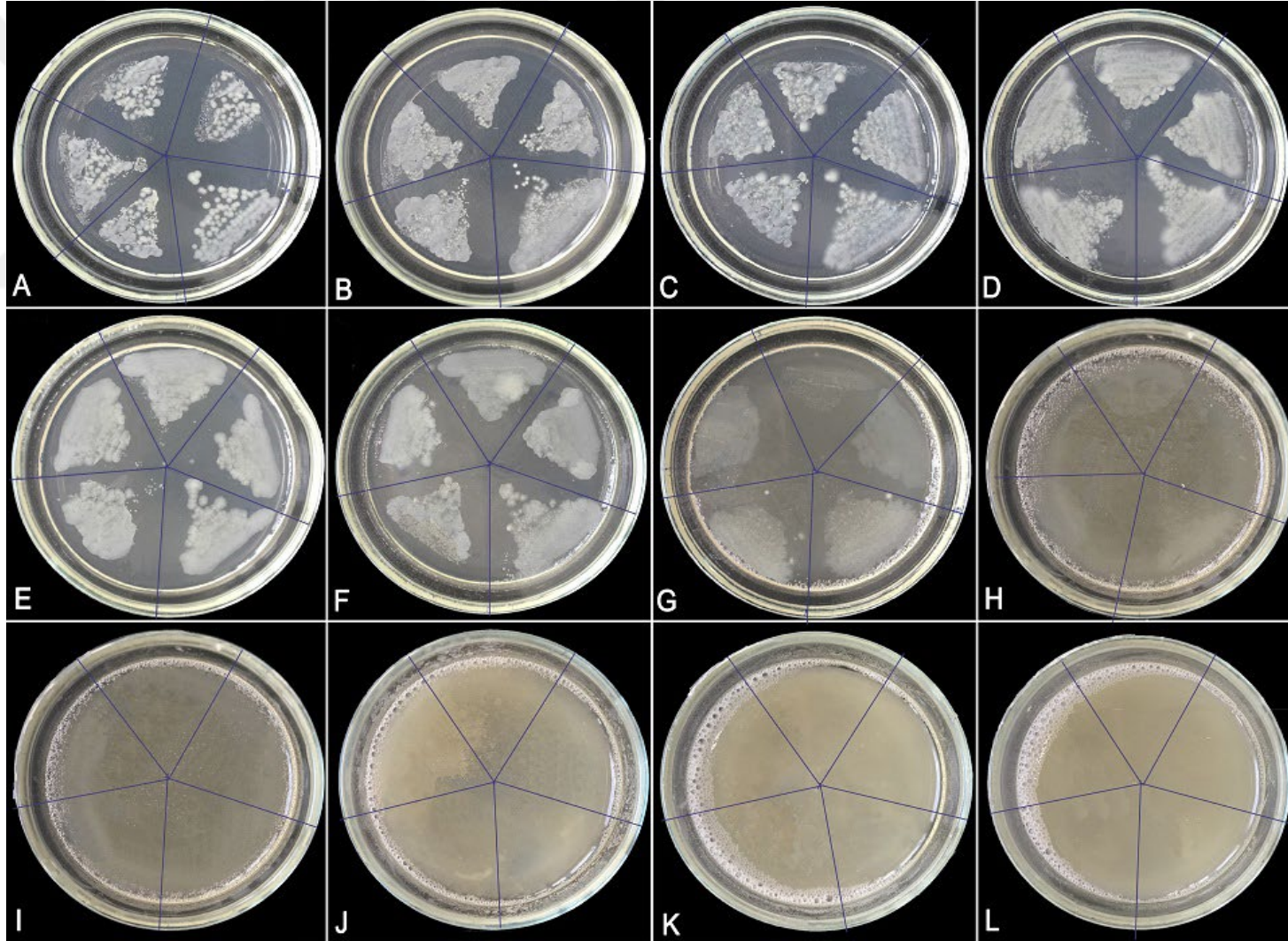
### 3.5 Mikrobiyal KS ve Ticari KS'nin *C. tropicalis*'e karşı Antifungal Aktivite Sonuçları

Agar dilüsyon yönteminin detaylı çalışmasında, *C. tropicalis* için 0.24 g/mL Mikrobiyal KS konsantrasyonunun kullanıldığı H plağından itibaren koloniler belirginleşmeye

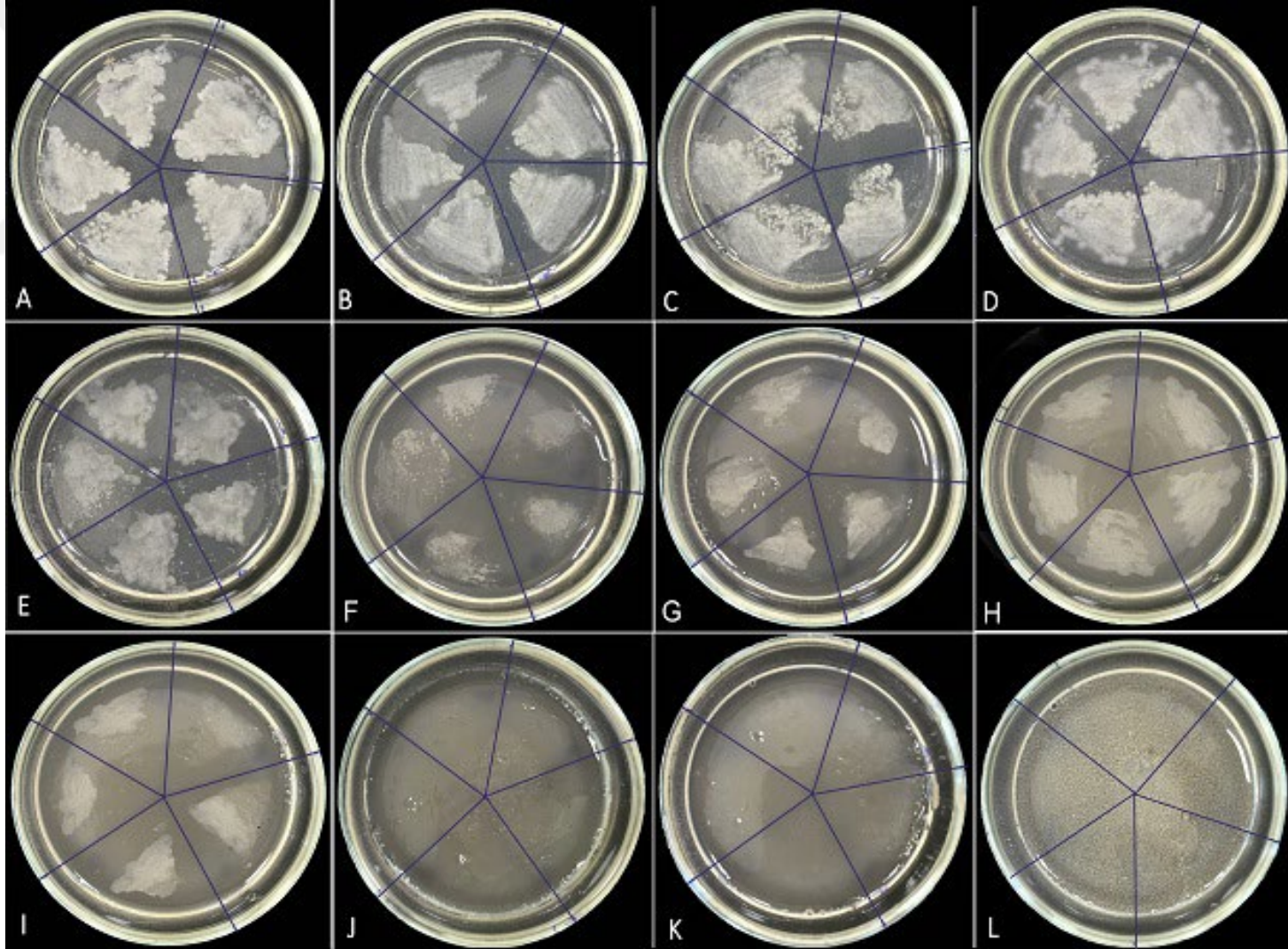
başlamıştır. Dolayısıyla, kontrol grubunun petri kapları (0 g/mL), 0.005, 0.01, 0.03, 0.06, 0.12, 0.18 ve 0.24 g/mL Mikrobiyal KS; sırasıyla A, B, C, D, E, F, G ve H plakları üzerinde beyaz *C. tropicalis* kolonileri görülmüştür. 0.3, 0.36, 0.42 ve 0.48 g/mL Mikrobiyal KS ile muamele edilmiş I, J, K ve L petri kaplarında hiçbir koloni tespit edilmemiştir. Dolayısıyla bu çalışmada Mikrobiyal KS'nin *C. tropicalis* üzerindeki antifungal etkisi belirgin olmakla beraber, *C. tropicalis* 'e karşı MİK değeri 0.30 g/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 3.10).

Ticari KS ile yapılan antifungal aktivite tayininde ise ticari KS'nin *C. tropicalis* üzerindeki antifungal etkisi azalarak, MİK değeri 0.36 g/mL olarak gözlenmiştir (Şekil 3.11).

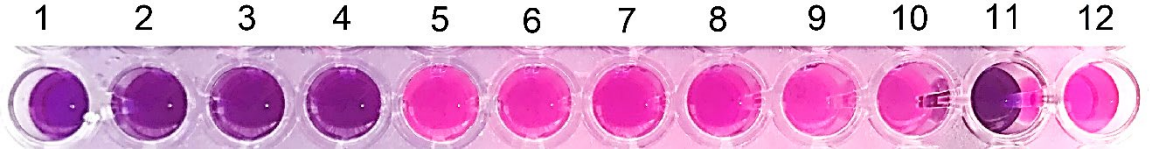




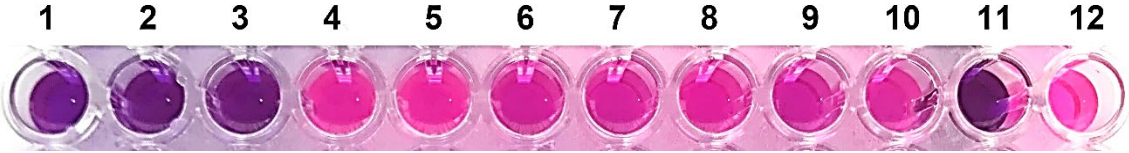
**Şekil 3.10:** Farklı konsantrasyonlardaki Mikrobiyal KS'nin *C. tropicalis* üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları. (A) Kontrol, (B)0.005, (C) 0.01, (D) 0.03, (E) 0.06, (F) 0.12, (G) 0.18, (H) 0.24, (I) 0.30 (MİK değeri), (J) 0.36, (K) 0.42, (L) 0.48 g/mL.



**Şekil 3.11:** Farklı konsantrasyonlardaki ticari KS'nin *C. tropicalis* üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları. (A) Kontrol, (B)0.005, (C) 0.01, (D) 0.03, (E) 0.06, (F) 0.12, (G) 0.18, (H) 0.24, (I) 0.30, (J) 0.36 (MİK değeri), (K) 0.42, (L) 0.48 g/mL.



**Şekil 3.12:** Mikrobiyal KS'nin *C. tropicalis*'e karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi. Herhangi bir renk değişikliğinin olmadığı 4. kuyucuktaki Mikrobiyal KS konsantrasyonu (% 30-0.30 g/mL) *C. tropicalis* için MİK değerleri olarak kabul edilmiştir.

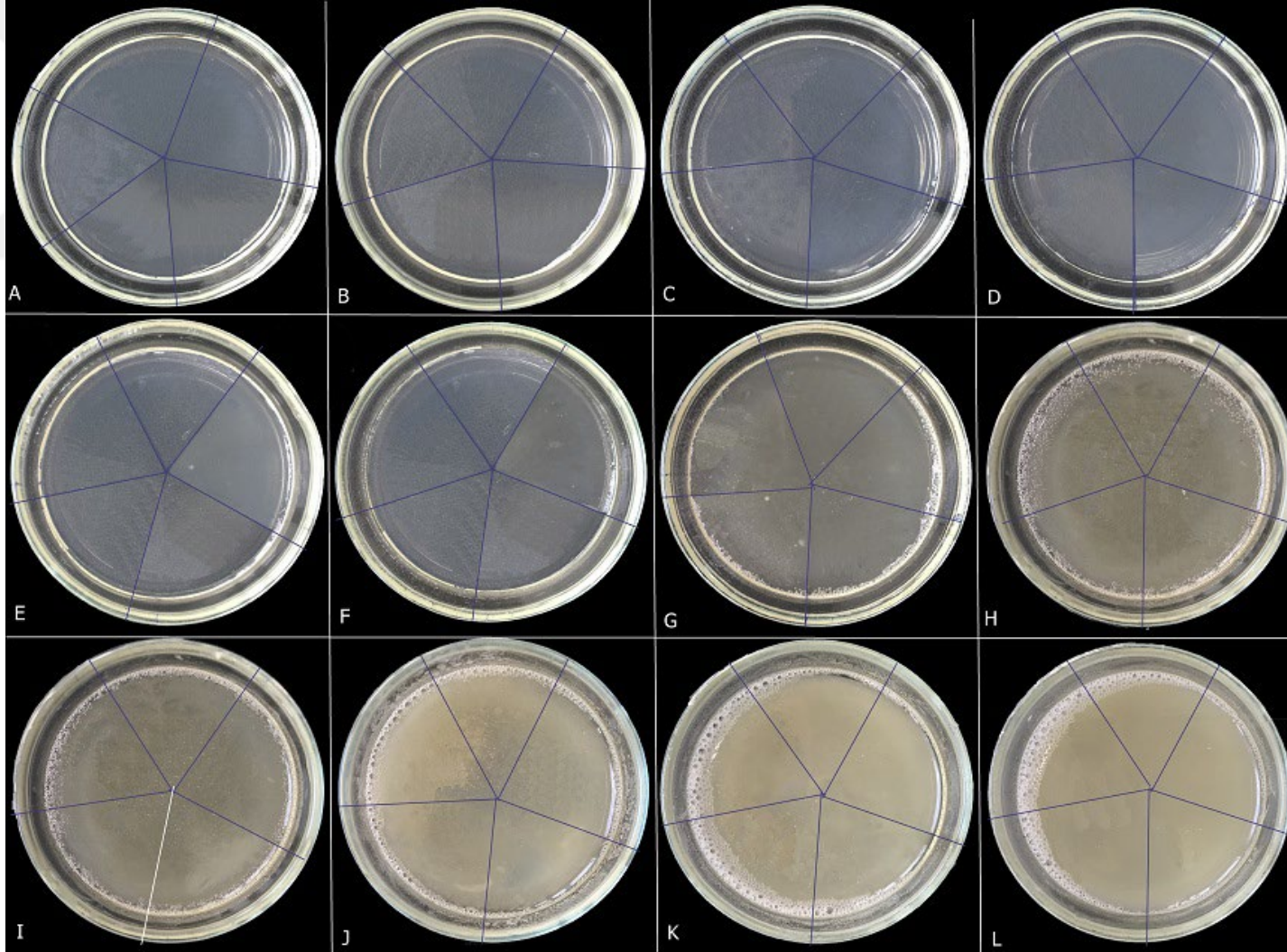


**Şekil 3.13:** Ticari KS'nin *C. tropicalis*'e karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi. Herhangi bir renk değişikliğinin olmadığı 3. kuyucuktaki Mikrobiyal KS konsantrasyonu (% 36-0.36 g/mL) *C. tropicalis* için MİK değerleri olarak kabul edilmiştir.

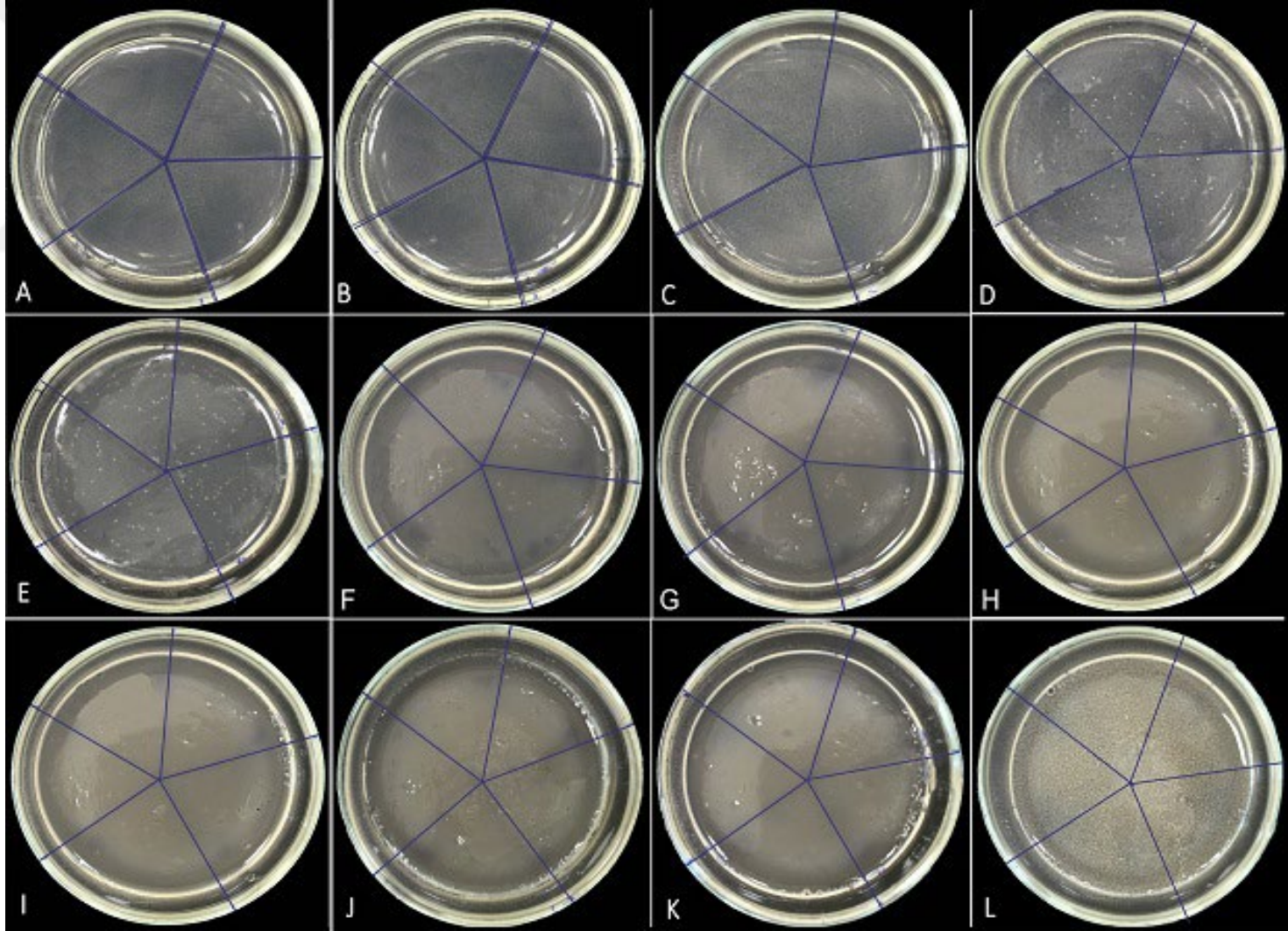
Broth Mikrodilüsyon yönteminde, hem Mikrobiyal KS'nin hem de ticari KS'nin *C. tropicalis*'e karşı antifungal aktivitesi tekrar edilmiştir. Mikropalaklar üzerindeki 1-10 arası kuyucuklara sırasıyla 0.48, 0.42, 0.36, 0.3, 0.24, 0.18, 0.12, 0.06, 0.03 ve 0.01 g/mL konsantrasyonlarında ayrı ayrı Mikrobiyal KS ve ticari KS eklenmiştir. 11. kuyucuk plak hazırlanırken herhangi bir kontaminasyonun olmadığını doğrulayan, 12. kuyucuk ise *C. tropicalis*'in canlılığını ifade eden kontrollerdir. Mikrobiyal KS'nin kullanıldığı bu çalışmanın sonucunda, *C. tropicalis* için MİK değeri, renk değişikliğinin görülmediği 4. Kuyucuktaki 0.30 g/mL olarak belirlenirken (Şekil 3.12); ticari KS'nin kullanıldığı çalışmanın sonucunda, *C. tropicalis* için MİK değeri, renk değişikliğinin görülmediği 3. Kuyucuktaki 0.36 g/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 3.13).

### 3.6 Mikrobiyal KS ve Ticari KS'nin *C. glabrata*'ya karşı Antifungal Aktivite Sonuçları

Agar dilüsyon yönteminin detaylı çalışmasında, Mikrobiyal KS'nin *C. glabrata*'ya karşı antifungal etkinliğinin tespitinde ise *C. glabrata* kontrol grubu dahil hiçbir plakta üreme göstermemiştir (Şekil 3.14). Aynı şekilde ticari KS'nin *C. glabrata*'ya karşı antifungal etkinliğinin belirlenmesi için yapılan çalışmada da plakların hiçbirinde üreme gözlenmemiştir (Şekil 3.15). Deney *C. glabrata*'nın ürettiği optimum PH değerine sahip Saboraud Dekstroz agarda tekrar edilmiştir ancak Mikrobiyal KS'nin Saboraud Dekstroz agarda bu mikroorganizma türü üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi gözlenmemiştir. Bununla ilgili ileri analizler yapılmıştır (Başlık 3.9).



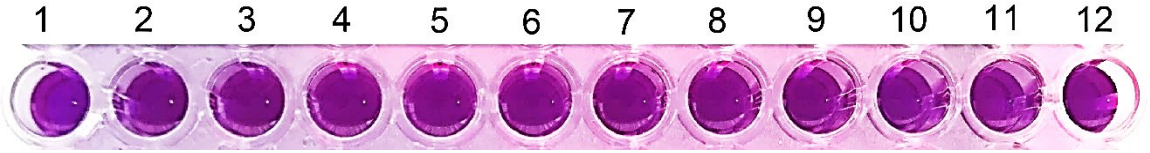
**Şekil 3.14:** Farklı konsantrasyonlardaki Mikrobiyal KS'nin *C. glabrata* üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları. (A) Kontrol, (B)0.005, (C) 0.01, (D) 0.03, (E) 0.06, (F) 0.12, (G) 0.18, (H) 0.24, (I) 0.30, (J) 0.36, (K) 0.42, (L) 0.48 g/mL. Hiçbir plakta üreme gözlenmemiştir.



**Şekil 3.15:** Farklı konsantrasyonlardaki ticari KS'nin *C. glabrata* üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları. (A) Kontrol, (B) 0.005, (C) 0.01, (D) 0.03, (E) 0.06, (F) 0.12, (G) 0.18, (H) 0.24, (I) 0.30, (J) 0.36, (K) 0.42, (L) 0.48 g/mL. Hiçbir plakta üreme gözlenmemiştir.

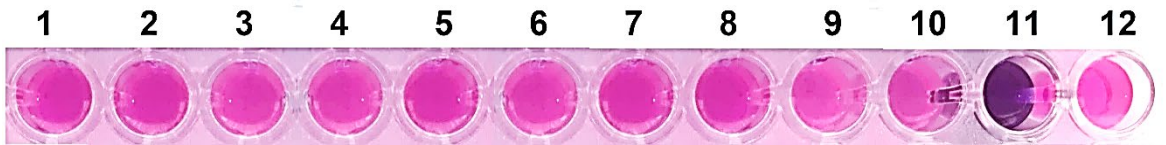


**Şekil 3.16:** Mikrobiyal KS'nin *C. glabrata*'ya karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi. *C. glabrata* ise kontrol dahil hiçbir kuyucukta üreme göstermemiştir.



**Şekil 3.17:** Ticari KS'nin *C. glabrata*'ya karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi.

Broth Mikrodilüsyon yönteminde, Mikrobiyal KS'nin *C. glabrata*'ya karşı antifungal aktivitesi tekrar edilmiştir. Mikropalak üzerindeki 1-10 arası kuyucuklara sırasıyla 0.48, 0.42, 0.36, 0.3, 0.24, 0.18, 0.12, 0.06, 0.03 ve 0.01 g/mL konsantrasyonlarında Mikrobiyal KS eklenmiştir. 11. Kuyucuk plak hazırlanırken herhangi bir kontaminasyonun olmadığını doğrulayan kontroldür. 12. kuyucuk *C. glabrata*'nın Mikrobiyal KS yokluğunda besiyeri içerisindeki canlılığını ifade eden kontroldür ve burada Muller Hinton Broth içerisinde *C. glabrata* üremesi gözlenmemiştir. Bu çalışma sonucunda agar dilüsyon yöntemine paralel olarak, hiçbir kuyucukta üreme gözlenmemiştir (Şekil 3.16). Aynı deney ticari KS için de tekrar edilmiş ve yine aynı sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 3.17).



**Şekil 3.18:** Mikrobiyal KS'nin *C. glabrata* karşı Saboraud Dekstroz Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi. 48 saatlik inkübasyondan sonra rezaurin eklenmiştir (pembe renk üremeyi göstermekte, mavi renk ise üremenin inhibisyonu anlamına gelmektedir). 1-10 farklı konsantrasyonlardaki Mikrobiyal KS bulunan kuyucuklara *C. glabrata* inoküle edilmiştir. 11. Negatif kontrol (Muller hinton Broth +. *C. glabrata*) 12. Pozitif kontrol (Saboraud dekstroz broth+ *C. glabrata*).

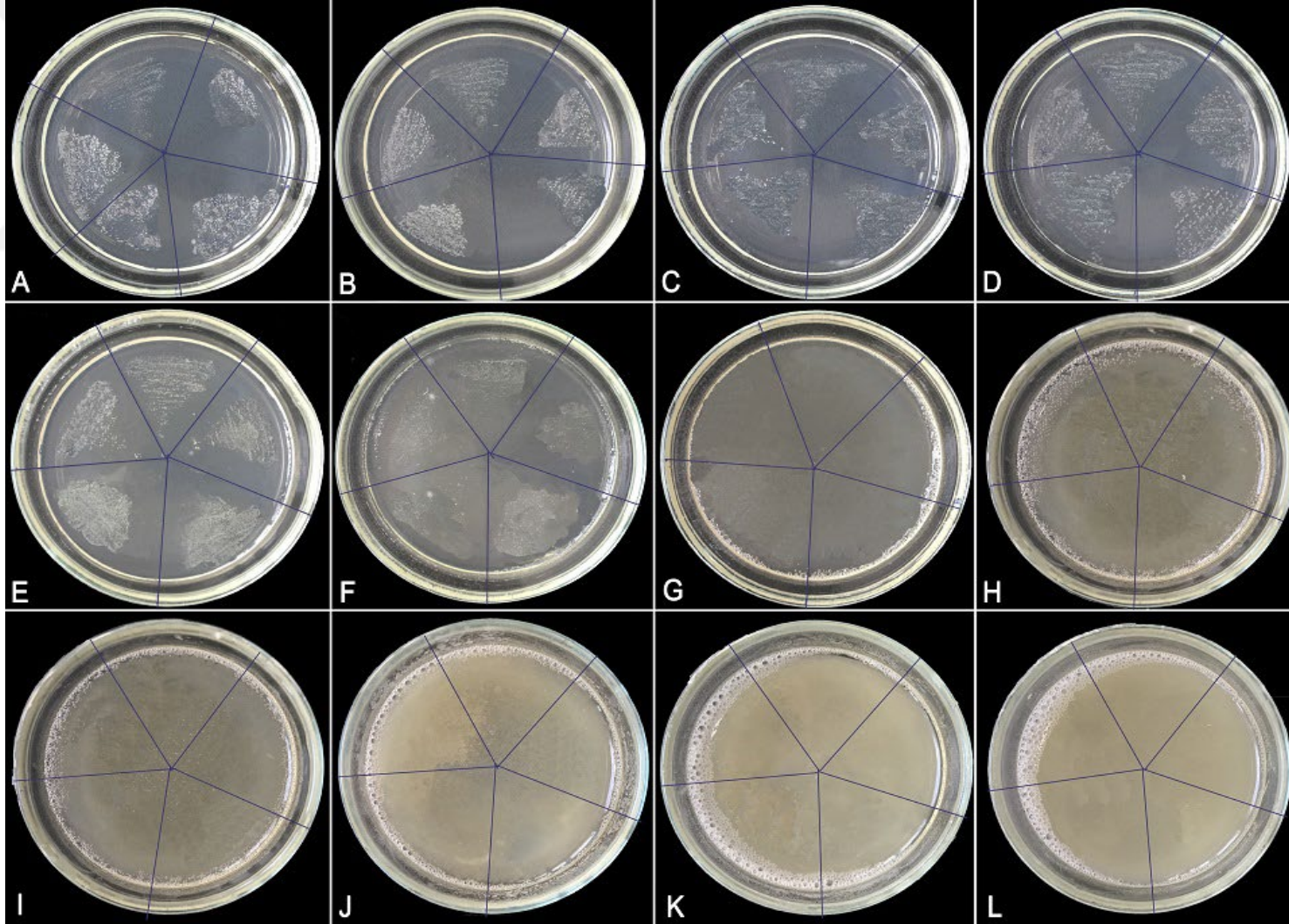
Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal mikrodilüsyon testinde *C. glabrata* kontrol kuyucukları dahil hiçbir kuyucukta üreme (renk değişikliği) göstermediğinden, deney *C. glabrata*'nın ürettiği optimum pH değerine sahip Saboraud Dekstroz Brothda tekrar edilmiştir. Ancak, burada da Saboraud Dekstroz Broth besiyerinin asidik ortamının Mikrobiyal KS yapısını bozduğundan tüm kuyucuklarda üreme gerçekleşmiş ve

Mikrobiyal KS'nin inhibitör etkisi gözlenmemiştir (Şekil 3.18). Bununla ilgili ileri analizler Başlık 3.9'da belirtilmiştir.

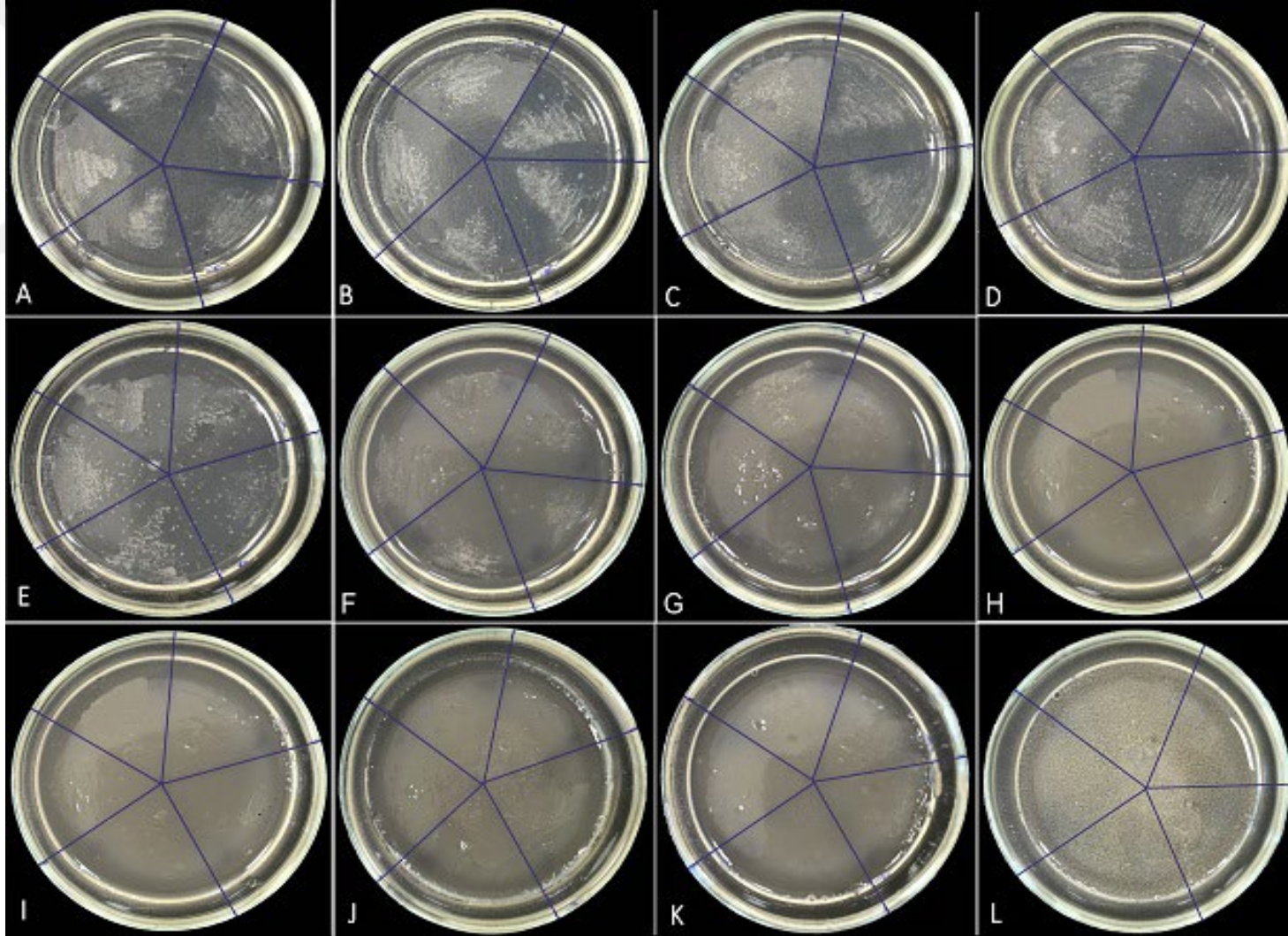
### **3.7 Mikrobiyal KS ve Ticari KS'nin *C. parapsilosis*'e karşı Antifungal Aktivite Sonuçları**

Agar dilüsyon yönteminin detaylı çalışmasında, Mikrobiyal KS'nin *C. parapsilosis*'e karşı antifungal etkinliği sonuçları Şekil 3.19'da gösterilmiştir. 37 °C'de iki günlük inkübasyondan sonra, *C. parapsilosis* için kontrol grubunun petri kapları (0 g/mL), 0.005, 0.01, 0.03, 0.06, ve 0.12 g/mL Mikrobiyal KS; sırasıyla A, B, C, D, E ve F plakları beyaz *C. parapsilosis* kolonileri ile kaplanmıştır. 0.18, 0.24, 0.3, 0.36, 0.42 ve 0.48 g/mL Mikrobiyal KS ile muamele edilmiş G, H, I, J, K ve L petri kaplarında hiçbir koloni tespit edilmemiştir. Dolayısıyla bu çalışmada Mikrobiyal KS'nin *C. parapsilosis*'e karşı MİK değeri 0.18 g/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 3.19).

Ticari KS'nin kullanıldığı çalışmada ise, Ticari KS Mikrobiyal KS'ye göre daha düşük etkinlik göstererek, Ticari KS'nin MİK değeri 0.24 g/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.20)



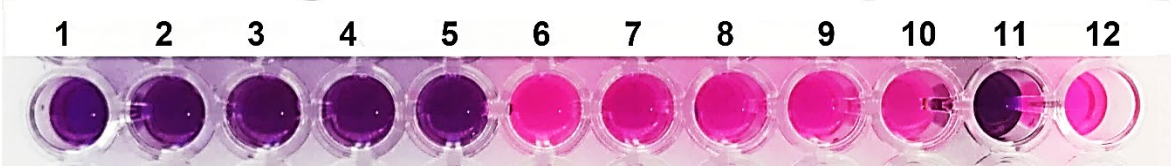
**Şekil 3.19:** Farklı konsantrasyonlardaki Mikrobiyal KS'nin *C. parapsilosis* üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları. (A) Kontrol, (B)0.005, (C) 0.01, (D) 0.03, (E) 0.06, (F) 0.12, (G) 0.18 (MİK değeri), (H) 0.24, (I) 0.30, (J) 0.36, (K) 0.42, (L) 0.48 g/mL.



**Şekil 3.20:** Farklı konsantrasyonlardaki ticari KS'nin *C. parapsilosis* üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları. (A) Kontrol, (B)0.005, (C) 0.01, (D) 0.03, (E) 0.06, (F) 0.12, (G) 0.18, (H) 0.24 (MİK değeri), (I) 0.30, (J) 0.36, (K) 0.42, (L) 0.48 g/mL.



**Şekil 3.21:** Mikrobiyal KS'nin *C. parapsilosis*'e karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikroplak resmi. Herhangi bir renk değişikliğinin olmadığı 6. kuyucuktaki Mikrobiyal KS konsantrasyonu (%18- 0.18 g/mL) *C. parapsilosis* için MİK değeri olarak kabul edilmiştir.



**Şekil 3.22:** Ticari KS'nin *C. parapsilosis*'e karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikroplak resmi. Herhangi bir renk değişikliğinin olmadığı 5. kuyucuktaki Mikrobiyal KS konsantrasyonu (%24- 0.24 g/mL) *C. parapsilosis* için MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

Yapılan Broth Mikrodilüsyon yönteminde, Mikrobiyal KS'nin *C. parapsilosis*'e karşı antifungal aktivitesi tekrar edilmiştir. Mikroplak üzerindeki 1-10 arası kuyucuklara sırasıyla 0.48, 0.42, 0.36, 0.3, 0.24, 0.18, 0.12, 0.06, 0.03 ve 0.01 g/mL konsantrasyonlarında Mikrobiyal KS eklenmiştir. 11. kuyucuk plak hazırlanırken herhangi bir kontaminasyonun olmadığını doğrulayan kontrolken, 12. kuyucuk *C. parapsilosis*'in canlılığını ifade eden kontroldür. Bu çalışma sonucunda, Mikrobiyal KS'nin *C. parapsilosis* için MİK değeri, agar dilüsyon yöntemine paralel olarak, renk değişikliğinin görülmediği 6. kuyucuktaki 0.18 g/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 3.21). Bu çalışma ticari KS ile tekrar edilmiş ve ticari KS'nin *C. parapsilosis* üzerindeki MİK değeri 5. kuyucuktaki daha yüksek konsantrasyon olan 0.24 g/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.22).

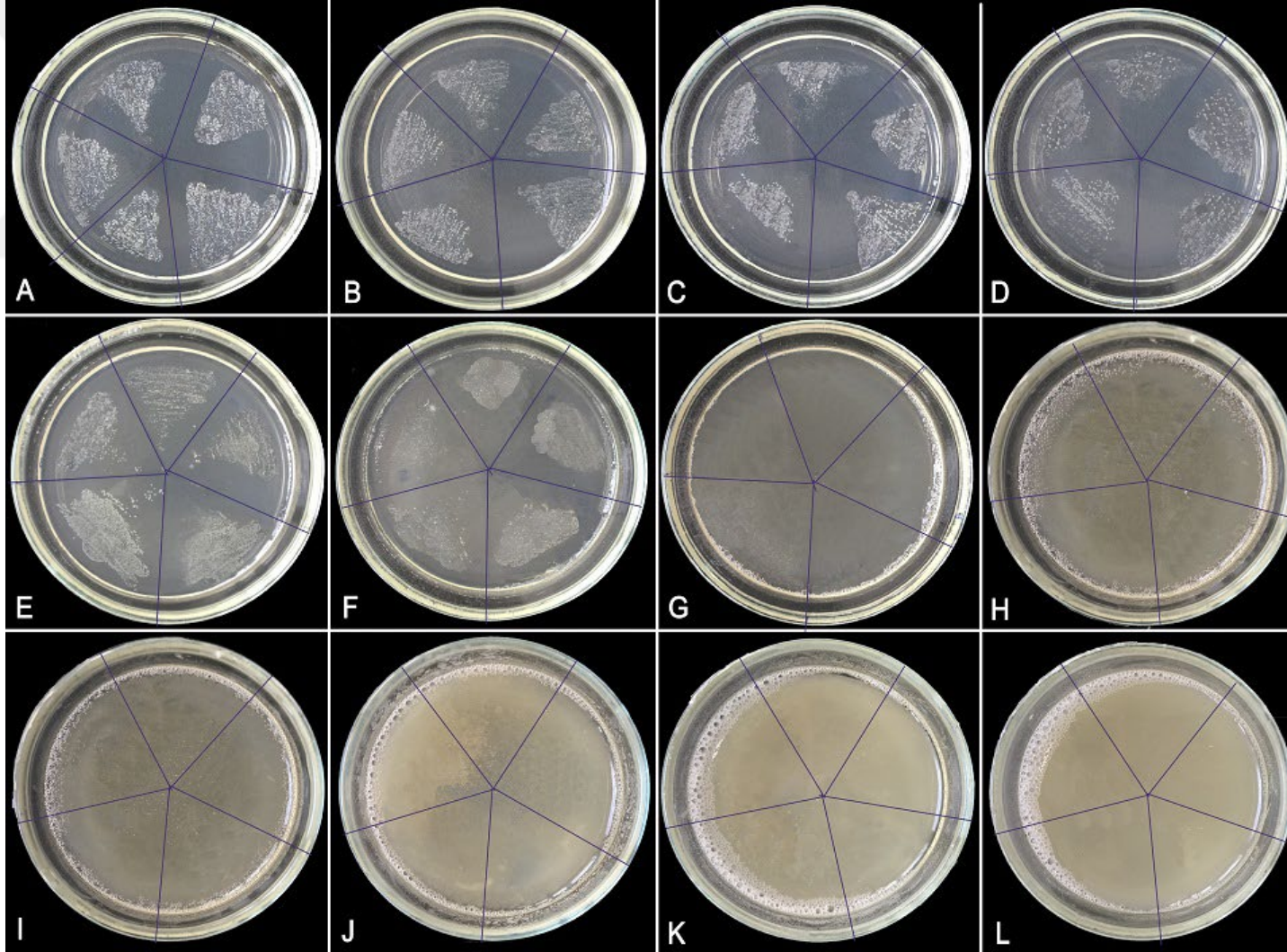
### 3.8 Mikrobiyal KS ve Ticari KS'nin *C. krusei*'ye karşı Antifungal Aktivite Sonuçları

Agar dilüsyon yönteminin detaylı çalışmasında, 0,12 g/mL Mikrobiyal KS konsantrasyonunun kullanıldığı F plağından itibaren *C. krusei* kolonileri belirginleşmeye başlamıştır. Dolayısıyla, kontrol grubunun petri kapları (0 g/mL), 0.005, 0.01, 0.03, 0.06 ve 0.12 g/mL Mikrobiyal KS; sırasıyla A, B, C, D, E ve F plakları üzerinde beyaz *C. krusei* kolonileri görülmüştür. 0.18, 0.24, 0.3, 0.36, 0.42 ve 0.48 g/mL Mikrobiyal KS ile muamele edilmiş G, H, I, J, K ve L petri kaplarında hiçbir koloni tespit edilmemiştir. Dolayısıyla bu çalışmada, kolonilerin görülmediği en düşük Mikrobiyal KS

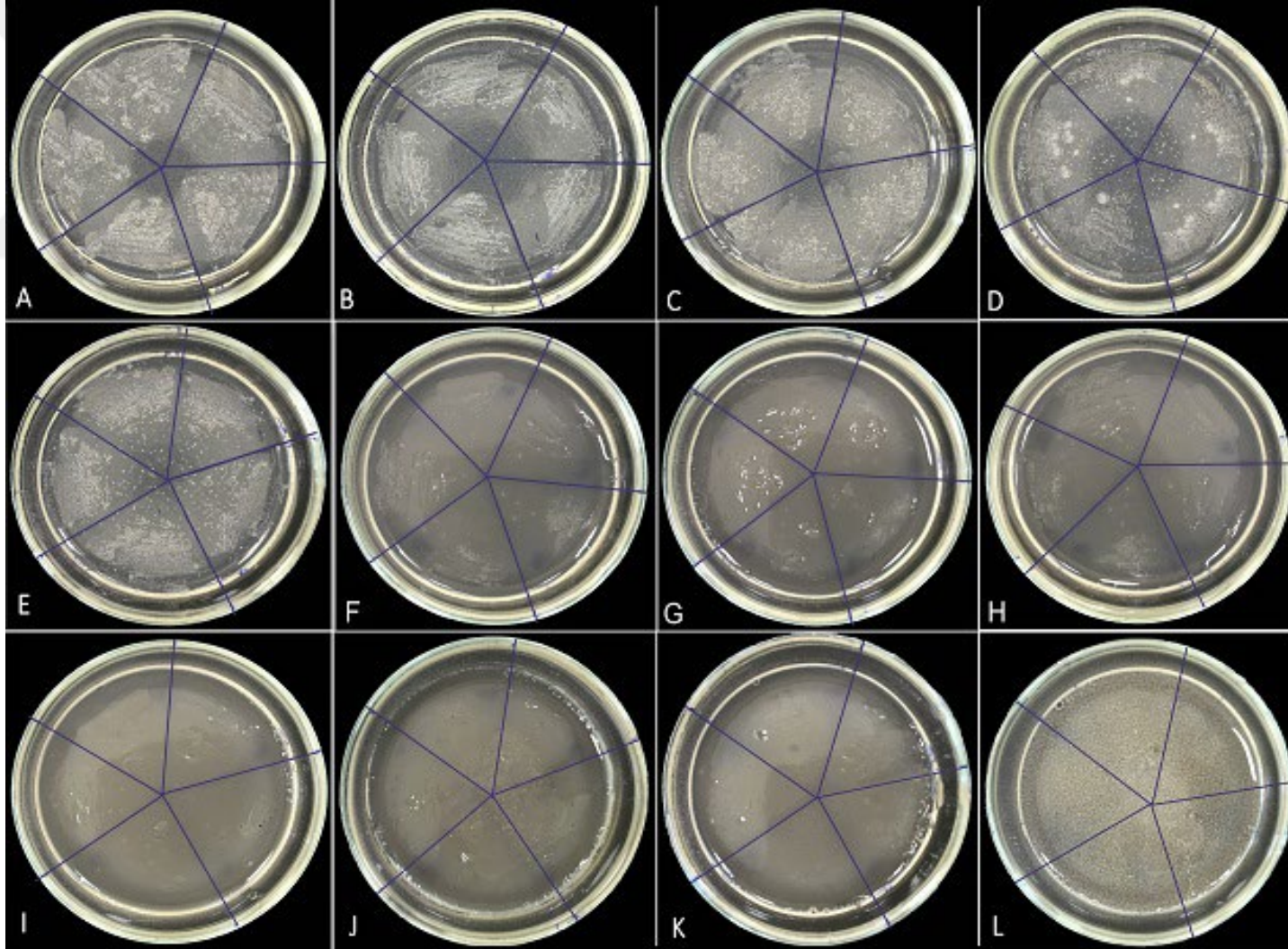
konsantrasyonu olan 0.18 g/mL değeri, Mikrobiyal KS' nin *C. krusei* 'ye karşı MİK değeri olarak belirlenmiştir (Şekil 3.23).

Yapılan bu çalışma ticari KS'nin etkinliğini görmek için tekrar edilmiştir. Ancak, ticari KS'nin *C. krusei* zerindeki inhibitör etkisinin Mikrobiyal KS kadar güçlü olmadığı görülmüştür. Ticari KS'nin *C. krusei* 'ye karşı MİK değeri 0.3 g/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.24).





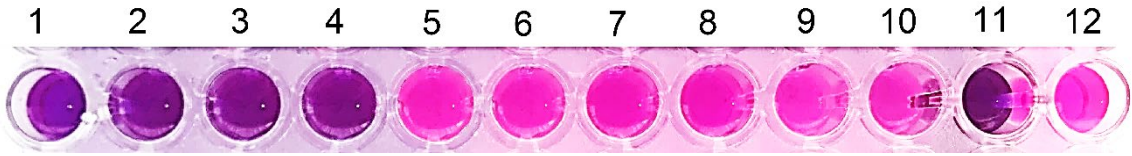
**Şekil 3.23:** Farklı konsantrasyonlardaki Mikrobiyal KS'nin *C. krusei* üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları. (A) Kontrol, (B)0.005, (C) 0.01, (D) 0.03, (E) 0.06, (F) 0.12, (G) 0.18 (MİK değeri), (H) 0.24, (I) 0.3, (J) 0.36, (K) 0.42, (L) 0.48 g/mL.



**Şekil 3.24:** Farklı konsantrasyonlardaki ticari KS'nin *C. krusei* üzerindeki antifungal aktivite test sonuçları. (A) Kontrol, (B)0.005, (C) 0.01, (D) 0.03, (E) 0.06, (F) 0.12, (G) 0.18, (H) 0.24, (I) 0.3 (MİK değeri), (J) 0.36, (K) 0.42, (L) 0.48 g/mL.



**Şekil 3.25:** Mikrobiyal KS'nin *C. krusei*'ye karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi. Herhangi bir renk değişikliğinin olmadığı 6. kuyucuktaki Mikrobiyal KS konsantrasyonu (% 18- 0.18 g/mL) *C. krusei* için MİK değeri olarak kabul edilmiştir.



**Şekil 3.26:** Ticari KS'nin *C. krusei*'ye karşı Muller Hinton Broth kullanılarak yapılan Antifungal aktivite testinin mikropalak resmi. Herhangi bir renk değişikliğinin olmadığı 4. kuyucuktaki Mikrobiyal KS konsantrasyonu (% 30- 0.3 g/mL) *C. krusei* için MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

Broth Mikrodilüsyon yönteminde, Mikrobiyal KS'nin *C. krusei*'ye karşı antifungal aktivitesi tekrar edilmiştir. Mikropalak üzerindeki 1-10 arası kuyucuklara sırasıyla 0.48, 0.42, 0.36, 0.3, 0.24, 0.18, 0.12, 0.06, 0.03 ve 0.01 g/mL konsantrasyonlarında Mikrobiyal KS eklenmiştir. 11. kuyucuk plak hazırlanırken herhangi bir kontaminasyonun olmadığını doğrulayan, 12. kuyucuk *C. krusei*'nin canlılığını ifade eden kontrollerdir. Bu çalışma sonucunda, Mikrobiyal KS'nin *C. krusei* için MİK değeri, renk değişikliğinin görülmediği 6. kuyucuktaki 0.18 g/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 3.25). Yapılan bu çalışma ticari KS için tekrar edilmiştir. Sonuçlar agar dilüsyon yöntemine paralellik göstermiştir. Ticari KS için MİK değeri renk değişikliğinin görülmediği 4. kuyucuktaki 0.3 g/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 3.26).

Sonuç olarak, yapılan tüm antifungal test sonuçları, MİK değerleri gözönüne alındığında, Mikrobiyal KS'nin diğer *Candida* türlerine nazaran *C. albicans* (MİK: 0.12 g/mL) ve ardından *C. parapsilosis* (MİK: 0.18 g/mL) ve *C. krusei*'ye (MİK: 0.18 g/mL) karşı inhibitor etkisinin daha kuvvetli olduğunu göstermiştir. Bunları *C. tropicalis* (MİK: 0.30 g/mL) takip etmektedir. *C. glabrata* için ise yapılan testler sonucunda her hangi bir sonuç alınamamıştır. Ticari KS ile yapılan antifungal test sonuçlarında ise, Mikrobiyal KS ile karşılaştırıldığında *C. albicans* (MİK: 0.24 g/mL) ve *C. krusei*'ye (MİK: 0.30 g/mL) karşı inhibitor etkisinin daha düşük olduğu görülmüştür. Bunu *C. parapsilosis* (MİK: 0.24 g/mL)

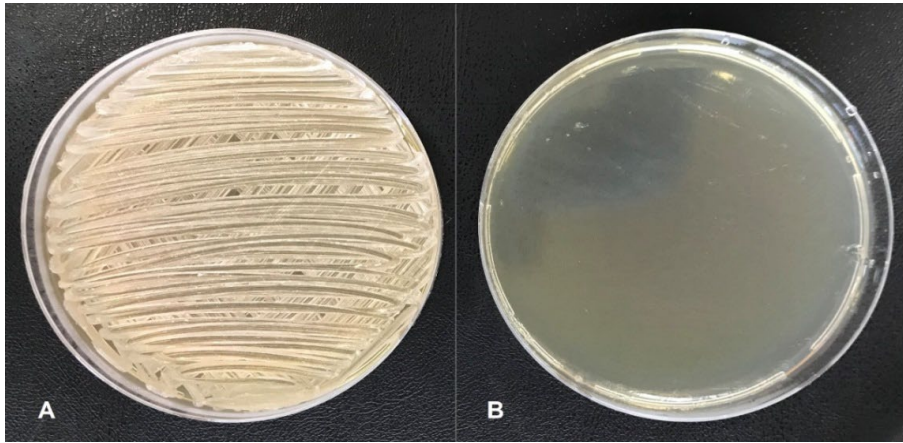
ve ardından *C. tropicalis* (MİK: 0.36 g/mL) takip etmektedir. Burada Mikrobiyal KS'nin *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* ve *C. krusei* üzerindeki inhibitör etkisinin ticari KS' ye göre daha yüksek olduğu belirgin bir şekilde tespit edilmiştir. Mikrobiyal KS ve ticari KS'nin MİK değerlerinin sonuçları karşılaştırmalı olarak Çizelge 3.1'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1:** Mikrobiyal KS ve ticari KS'nin MİK değerlerinin karşılaştırmalı sonuçları

| Mikroorganizmalar      | Mikrobiyal KS (g/mL) | Ticari KS (g/mL) |
|------------------------|----------------------|------------------|
| <i>C. albicans</i>     | 0.12                 | 0.24             |
| <i>C. tropicalis</i>   | 0.30                 | 0.36             |
| <i>C. parapsilosis</i> | 0.18                 | 0.24             |
| <i>C. krusei</i>       | 0.18                 | 0.30             |

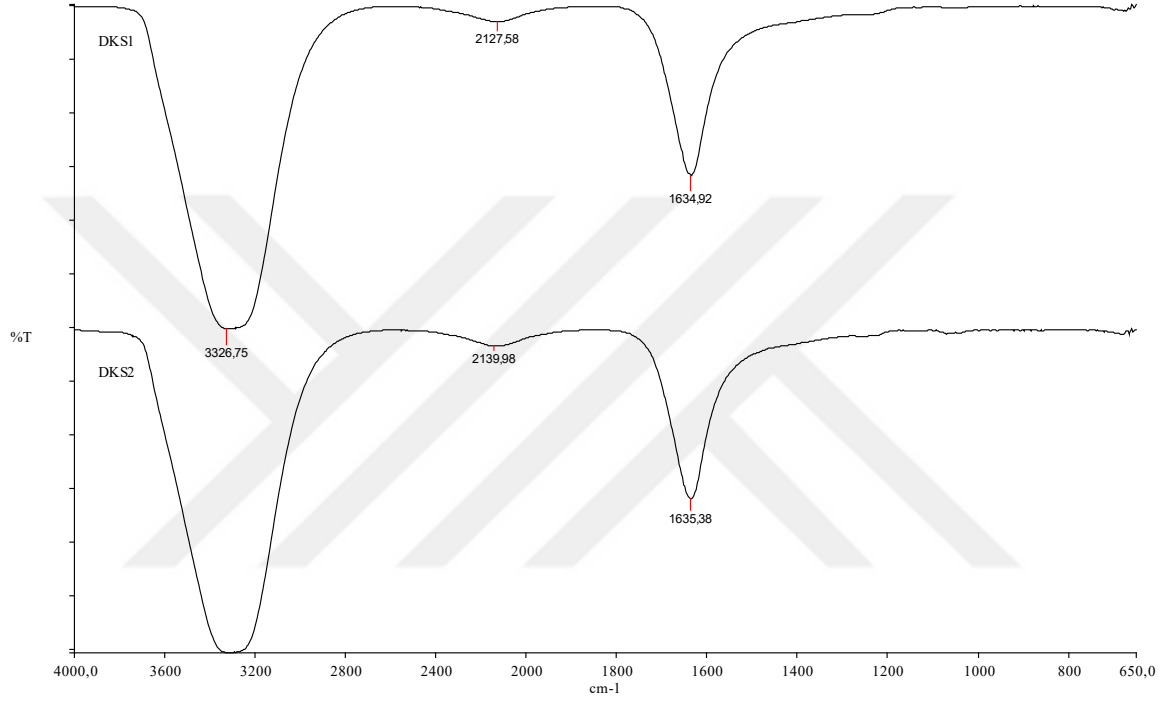
### 3.9 FT-IR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi) Analizleri

Bu teknik ile organik veya inorganik yapıdaki katı, sıvı veya gaz örneklerin kalitatif ve kantitatif analizlerini yapılmaktadır. *C. glabrata*'nın üremek ihtiyaç duyduğu asidik ortam düşünüldüğünde Muller Hinton Agar besiyerinde üremediği düşünülmüştür (Şekil 3.27.). Bu yüzden deney *C. glabrata*'nın üreme gösterdiği optimum pH değerini taşıyan Saboraud Dekstroz agar ortamında deney tekrarlanırsa da bu mikroorganizmanın kontrol grubu dahil tüm plaklarda üremesinin gözlenmesiyle Mikrobiyal KS'nin asidik ortamda etkinliğinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

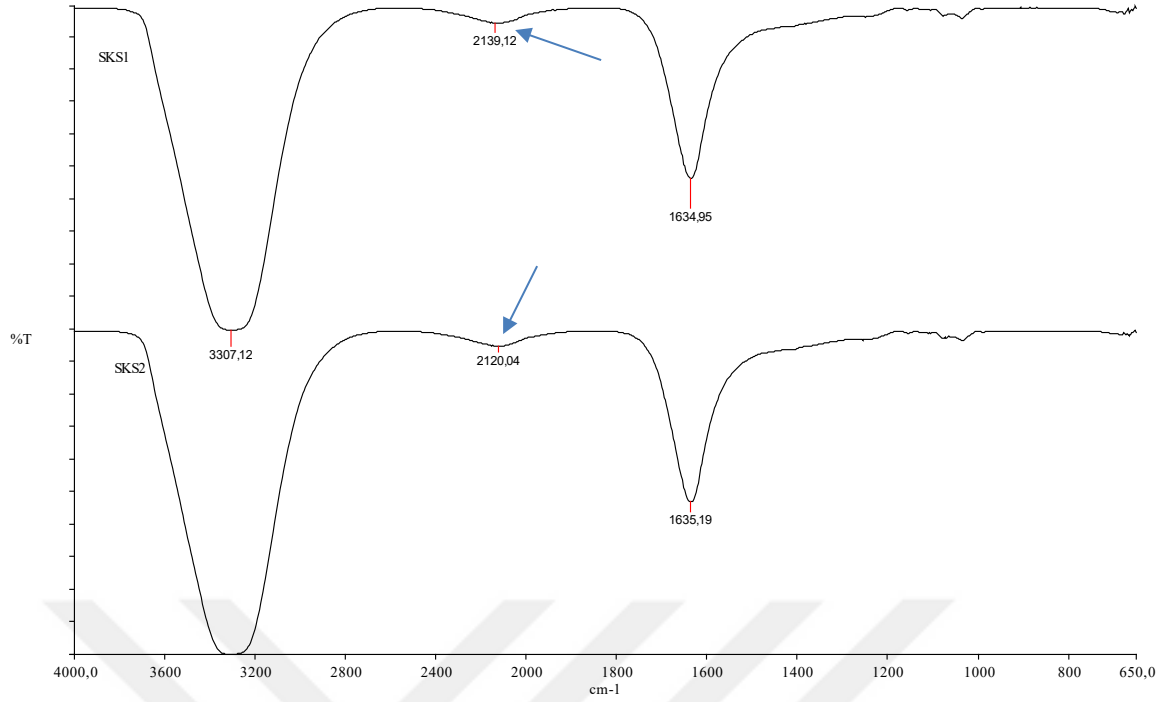


**Şekil 3.27:** A. Saboraud Dekstroz Agar besiyerine ekimi yapılmış *C. glabrata* (koloni-üreme gözlenmiştir), B. Muller Hinton Agar besiyerine ekimi yapılmış *C. glabrata* (koloni-üreme gözlenmemiştir).

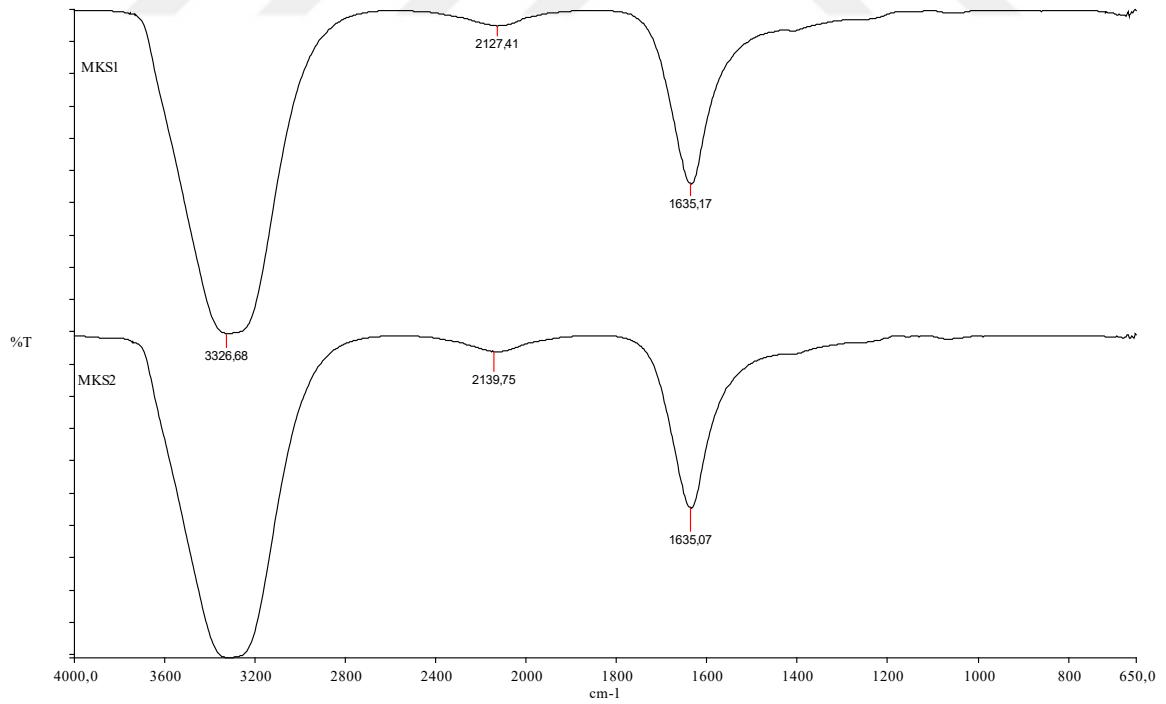
Mikrobiyal KS'nin distile su, Muller Hinton Broth ve Saboraud Dekstroz Broth içindeki kimyasal yapısının stabil olup olmadığı ile ilgili FT-IR sonuçları Şekil 3.28, 3.29 ve 3.30'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Her bir örnek için 5 mg Mikrobiyal KS sırasıyla 200 µl'lik distile su, Muller Hinton Broth ve Saboraud Dekstroz Broth içerisine eklenmiştir, ve her üç örneğin ilk saatte ve 24. saatte FT-IR analizleri yapılmıştır. FT-IR analizleri İBTAM (İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi) bünyesinde yapılmış olup Shimadzu-IRPrestige 21 cihazında yapılmıştır.



**Şekil 3.28:** DKS1 numaralı çizgi distile su içerisindeki MKS'nin ilk saatteki FT-IR sonucunu göstermektedir. DKS2 numaralı çizgi distile su içerisinde 24 saat bekletildikten sonraki MKS'nin FT-IR sonucunu göstermektedir.



**Şekil 3.29:** SKS1 numaralı çizgi Sabraud Dekstroz Broth içerisindeki MKS'nin ilk saatteki FT-IR sonucunu göstermektedir. SKS2 numaralı çizgi Sabraud Dekstroz Broth içerisinde 24 saat bekletildikten sonraki MKS'nin FT-IR sonucunu göstermektedir. Mavi okla gösterilen değerlerdeki farklılıklar Sabraud Dekstroz Broth içerisindeki MKS'nin 24. saatte bozunduğunu göstermektedir.



**Şekil 3.30:** MKS1 numaralı çizgi Muller Hinton Broth içerisindeki MKS'nin ilk saatteki FT-IR sonucunu göstermektedir. MKS2 numaralı çizgi Muller Hinton Broth içerisinde 24 saat bekletildikten sonraki MKS'nin FT-IR sonucunu göstermektedir.

Yapılan FT-IR analizi sonuçlarına göre, Muller hinton broth, Saboraud dekstroz broth ve distile su içerisindeki Mikrobiyal KS'nin 1. ve 24. saatteki sonuçları karşılaştırıldığında, Muller hinton broth ve distile su içerisindeki Mikrobiyal KS'de herhangi bir değişiklik (bozunma) görülmemiştir. Ancak Saboraud dekstroz broth içerisindeki Mikrobiyal KS'nin 24. Saat sonunda bozunduğu görülmektedir.



#### 4. TARTIŞMA

GAG'lar vücutta bulunan birçok fizyolojik süreçte önemli bir rol oynamaktadır. GAG'larla ilgili patofizyolojik süreçler, GAG'ların vücutta her yerde mevcut olmasından dolayı çok geniş bir aralığı kapsamaktadır. Hücre büyümesinin düzenlenmesi, proliferasyon, hücre adezyonunun teşviki, antikoagülasyon ve yara onarımı dahil olmak üzere hücre sinyal sürecinde çok önemli bir rol oynamaktadır (Casale ve Crane, 2021). GAG'lar, çeşitli viral, bakteriyel, fungal ve parazitik patojenlerin bulaşıcı süreçleri için çok önemlidir. Dermal enfeksiyona sebep olan patojenler, GAG'ları hedeflemektedir. Sağlam bir cilt epiteli, fiziksel bir bariyer sağlayarak, vücudun enfeksiyonlara karşı en önemli savunmasıdır. Cildin bu dış tabakası zayıfladığında, patojenler GAG'ları kullanarak enfeksiyona neden olmak için çoğalabilmektedir. Örneğin Merkel hücreli polioma virüsü, enfeksiyona neden olmak için konakçı hücreleri bağlamak ve istila etmek için dermal hücre yüzeylerinde HS ve KS'yi kullanan çift sarmallı bir DNA virüsüdür. *Streptococcus pyogenes*, GAG'ların kullanıldığı başka bir mekanizmayı temsil eden Gram pozitif bakterilerdir. *S. pyogenes*, moleküler taklit yoluyla konakçı bağışıklık savunmalarından kaçmak için HA'lardan oluşan bir kapsül kullanmaktadır. Dermis ve epidermiste hâlihazırda bulunan HA bolluğu nedeniyle, *S. pyogenes* 'ın HA kapsülü, konakçı lökositler tarafından tanınmayı ve müteakip fagositozu önler. Deri enfeksiyonunu desteklemek için GAG'ları kullanan diğer patojenlerin örnekleri arasında Herpes Simplex Virüsü, *Candida*, *Staphylococcus aureus* ve *Leishmania* bulunmaktadır (Casale ve Crane, 2021). Dolayısıyla enfeksiyon etkeni mikroorganizmaların patojenitelerini gösterebilmeleri için GAG'ları hedef görmeleri de, vücutta yapısal yada flora bütünlüğü bozulmuş dokulardaki GAG bütünlüğünün geri kazanımının da ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Bu alanda yaptığımız literatür araştırmalarında, KS ile ilgili bir antifungal araştırmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız bu alanda literatüre özgün ve öncül katkı niteliği taşımaktadır.

Mantar hastalıklarının şiddeti, mayanın türüne ve vücudun enfekte olduğu bölgeye göre büyük ölçüde değişmektedir. 2017 yılında yapılan bir çalışmada, ABD'de 2005 ile 2014 yılları arasında mantar hastalıklarının tedavisi için 7,2 milyar dolardan fazla harcama yapıldığı bildirilmiştir (Benedict ve diğ., 2019). Aynı zamanda *Candida* enfeksiyonlarının

mantar hastalıklarının en önemli kısmını oluşturduğu da belgelenmiştir. Mantar hastalığının tedavi süreci, yoğun antibiyotik ve antifungal tedavisi ile süregelmiştir. Antibiyotik ve antifungal kullanımı bazı hallerde zorunluluk olsa da uzun süreli kullanımda vücuda verdiği zararlar bilinmektedir. Bunlar tedavi edici özelliği olan ancak doğal olmayan kimyasal tedavi ajanlarıdır. Bunun yanı sıra, Antifungal ilaç direnci, vajinal kandidiyazis ve diğer birçok mantar hastalığında önemli bir sorundur. Ayrıca, son çeyrek asırda tıp merkezlerindeki görülme sıklığı artmıştır (Fong, 1996; Cowen ve diğ, 2014). Aynı zamanda mantar hastalıklarının tedavi süresinin uzun olması ve hastaların tedavisindeki zorluklar araştırmacıları alternatif kanallara yöneltmiştir. Bu nedenlerle antifungal ilaçlar yerine alternatif doğal antifungal ajanların kullanılması önemlidir. Tezimizde Mikrobiyal KS, doğal yapısı ile agar dilüsyon ve broth dilüsyon yöntemlerini kullanarak yaptığımız test sonuçlarına göre antifungal aktivite göstermiştir. Tezimizde kullanılan 5 tür *Candida* suşunda Mikrobiyal KS'nin antifungal etkinliği kanıtlanmıştır. Mikrobiyal KS'nin *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* üzerindeki MİK değerleri sırasıyla 0,12 g/mL, 0,18 g/mL, 0,18 g/mL ve 0,30 g/mL olarak belirlenmiştir.

*Candida* enfeksiyonları özellikle üremek için doğal koşulları sağlayan kutanöz tabakada ve mukoza zarında meydana gelmektedir. Bunlar mukozal kandidiyazis, kutanöz kandidiyazis, sistemik kandidiyazis ve antibiyotik kaynaklı kandidiyazis olarak çeşitlenmektedir. Mukozal kandidiyazis; vajinal kandidiyazisle beraber oral kandidiyazis, gastrointestinal kandidiyazis ve solunum kandidiyazisi gibi konakçının mukozal dokusunu etkilerken; kutanöz kandidiyazis ise cildi, cilt gözeneklerini ve tırnakları etkilemektedir. Sistemik kandidiyazis ise sepsis ve kandidemi gibi iç organları ve kan dolaşımını etkilemektedir. Antibiyotiklerin kaynaklı kandidiyazis, iyatrojenik kandidiyaz olarak da bilinmektedir (Aryal, 2021). Antifungal ajanların literatürde bahsedilen etkileri ile Mikrobiyal KS'nin polianyonik yapısı ile membran fosfolipitlerine etkisi kaynaklı olduğunu düşündüğümüz antifungal ajan aktivitesi örtüşmektedir.

Mevcut literatür değerlendirildiğinde, patojen proteinler ve konak hücre GAG'ları arasındaki etkileşim yoluyla patojen mikroorganizmalar konak hücre yüzeyine bağlanarak etkinliğini göstermektedirler. Eksojen GAG'lar ortama konulduğunda, konak hücre GAG'leri ile rekabet etmekte ve mikrobiyal proteinlere bağlanarak patojenin konak hücrelere bağlanmasını engellemektedir (Pomin 2017). Bu yönü ile Mikrobiyal KS kompetitif bir etki ile *Candida* kaynaklı proteinlerin vaginal epitel hücrelerine zarar vermesini engellemekte fungisitatik bir etki oluşturmaktadır. Ayrıca Mikrobiyal KS

polianyonik karakteri ile anyonik polimerlerin nispeten serbest katyonlarının, hücre duvarının anyonik fosfat grupları ile daha kolay etkileşime girme özelliği nedeni ile *Candida* hücrelerinin membranlarındaki fosfat gruplarına bağlanarak hücre membran yapısını bozmakta ve hücrenin lizisine neden olarak fungisidal etki göstermektedir (Guo et al. 2017; He et al. 2020). Yaptığımız çalışma özellikle vajinal kandidiyazis tedavisi amaçlı *Candida* türlerinin antifungal etkinliğini kanıtlaya da yukarıda tanımlanan tüm *Candida* enfeksiyonları için Mikrobiyal KS terapötik bir ajan olarak kullanım potansiyeli taşımaktadır.

Candidal enfeksiyonların oluşmasının sebebi olarak geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, doğum kontrol haplarının ve oral kortikosteroidlerin kullanımı, kanser tedavileri, diyabet ve zayıf bağışıklık sistemi gösterilmektedir. Yapılan bir kohort çalışmasında non-*albicans Candida* enfeksiyonlarının son zamanlarda antibiyotik kullanımı, diyabet ve probiyotik kullanımından etkilenmediği saptanmıştır (Tressler ve diğ, 2018). Buna ek olarak, non-*albicans Candida* 'nın neden olduğu vajinal kandidiyazis tedavisi daha zor olabilmekte ve genellikle daha agresif bir tedavi gerektirmektedir (Deorukhkar ve diğ, 2014; Fong, 1996). Mevcut literatüre göre, tezimizde etkili bir antifungal bileşik olarak gözlemlediğimiz Mikrobiyal KS, klinikte tedavisi zor olan non-*albicans Candida* türlerine agresif ilaç tedavisi yerine, doğal bir tedavi edici ajan olma niteliğine sahiptir.

*Candida* enfeksiyonların tedavisindeki başarısızlıkların nedenlerinden biri, *C. albicans*'ın mutasyonlar yoluyla antifungal direnç kazanmasıdır. Flukonazol, en yaygın kullanılan antifungallerden biridir. Ancak, *C. albicans*'da flukonazol direnci geliştirmiştir. Aynı zamanda bazı klinik izolatların mutasyonları edinmeden yüksek flukonazol konsantrasyonlarını tolere ederek hayatta kalabildikleri belgelenmiştir (Delarze ve diğ, 2020). *C. tropicalis* tedavisi için ise yine yaygın olarak flukonazol (epitel hücrelerine yapışmaya yardımcı fosfolipaz bağlantısına karşı etkili olan bir madde) kullanılırken, bu mikroorganizma da yine zamanla flukonazole direnç geliştirmiştir ve bu nedenle tekrarlayan kandidiyazis vakaları görülebilmektedir. Literatürde risk olarak gösterilen kimyasal ajanların yerine doğal yapıya sahip bir ajan olarak Mikrobiyal KS mutasyon ve direnç risklerini de elimine edecek bir karakteristiğe sahip olmaktadır.

Non-*albicans Candida* kaynaklı ölüm oranı yoğun bakım ve cerrahi hastalarda en yüksek; çocuklarda, kanser hastalarında ve HIV pozitif hastalarda daha düşüktür. Non-*albicans Candida* türlerinin enfeksiyon oluşturmaları için çeşitli risk faktörleri vardır. Bu risk

faktörleri, *C. parapsilosis* için vücuda yabancı cisim yerleştirilmesi, yenidoğanlar ve hiperalimentasyon ile ilgiliyken, *C. krusei* için azol profilaksisi, *C. tropicalis* için nütropeni ve kemik iliği nakli, *C. glabrata* için ise azol profilaksisi, cerrahi, vasküler ve üriner kateterlerdir. Non-*albicans Candida* türlerinin bir kısmı doğal olarak veya ikincil olarak flukonazole dirençlilik göstermektedir. *C. krusei* suşlarının % 75'i, *C. glabrata*'nın 35'i, ve *C. tropicalis*'in % 10-25'i bu dirençliliği gösteren türlerdir. Amfoterisin B direnci de *C. krusei*'nin % 10-15'inde görülmektedir. Diğer non-*albicans Candida* türlerinden *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* ise *C. albicans* gibi hem azollere hem de polienlere duyarlıdır. Dolayısıyla mantar enfeksiyonları için varlığı tespit edilen türe özgü antifungal tedavisi uygulanmaktadır (Kremery ve Barnes, 2002). Bu durum, yıllar geçtikçe vajinal kandidiyazis yada *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda, diğer tüm patojenik mikroorganizmalarda da görüldüğü gibi *Candida* türlerinde de dönemin antifungal kimyasallarına karşı zamanla direnç gelişebileceğini göstermektedir. Mikrobiyal KS gibi biyoteknolojik yöntemlerle geliştirilen yan etkisiz ve doğal ajanların kullanılması non-*albicans Candida* türleri için de oldukça avantajlıdır.

*C. krusei*, hematolojik maligniteleri olan hastalar ve transplant alıcılarında enfeksiyon etkeni olan bir mantar patojeni olarak iyi bilinmektedir. *C. krusei*'nin, hem flusitozin hem de amfoterisin B'ye karşı azalmış duyarlılığıyla birlikte flukonazol direnci nedeniyle potansiyel olarak çoklu ilaca dirençli bir mantar patojeni olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir (Drago ve diğ, 2004; Abbas ve diğ, 2000; Abi-Said ve diğ, 1997). Yapılan bazı çalışmalarda, flukonazol veya amfoterisin B alan hastalarda *C. krusei*'ye bağlı süper enfeksiyonlar bildirilmiştir (Majoros ve diğ, 2006; Abbas ve diğ, 2000). Ayrıca, amfoterisin B, *C. albicans*'a kıyasla *C. krusei*'ye karşı belirgin şekilde gecikmiş öldürme kinetiği sergilemektedir (Majoros ve diğ, 2006). *C. krusei* tarafından sergilenen çoklu ilaca direnç fenotipi, daha önce flukonazole maruz kalmış hastalar için özellikle nütropenik ve kritik hastalar için tedavi seçenekleri düşünüldüğünde terapötik bir ikilem teşkil etmektedir (Pfaller ve diğ, 2008). Tüm bunların yanında, yaptığımız çalışmada Mikrobiyal KS'nin diğer *Candida* türleriyle birlikte değerlendirildiğinde *C. krusei*'ye karşı etkinliğinin yüksek olması çoklu ilaç direnci gösteren bu mikroorganizmanın sebep olduğu enfeksiyonun tedavisini kolaylaştıracak ve çoklu ilaç direnci noktasında pratisyenlere destek sağlayacaktır.

İntravenöz narkotik bağımlılarında, *C. parapsilosis* endokardit ile ilişkilendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, *C. parapsilosis*, fungemi, endokardit, endoftalmi, septik artrit gibi

klirik belirtilerle birlikte önemli bir hastane patojeni olarak gözlenmiş ve bunların tümü genellikle invaziv prosedürler veya prostetik cihazlarla bağlantılı olarak ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla *C. parapsilosis* enfeksiyon salgınları, intravasküler basınç izleme cihazlarının ve klinikte hastalara uygulanan rutin solüsyonların kontaminasyonu sonucunda oluşmuştur. Deneysel çalışmalar genellikle *C. parapsilosis*'in *C. albicans* veya *C. tropicalis*'ten daha az öldürücü olduğunu gösterse de, *C. parapsilosis*'in hastane ortamlarında hızlı yayılması, ciltte oluşturduğu sık kolonizasyon, özellikle glikoz içeren çözeltilerde çoğalma yeteneği ve sentetik malzemelere yapışma özelliği, *C. parapsilosis* enfeksiyonlarının yoğunluğunu arttırmaktadır (Weems Jr, 1992). Yaptığımız çalışmada Mikrobiyal KS'nin inhibitör aktivitesinin en etkin *C. albicans* ve *C. krusei* ile beraber *C. parapsilosis* türleri üzerine olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla Mikrobiyal KS'nin özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonları önlemede potansiyel profilaktik ajan olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

Yapılan saha araştırmaları sonrası vajinal kandidiyazdan muzdarip hastaların tedavilerinin rutinde tek kutuluk (7 günlük) tedavilerinin yetersiz geldiği ve ikinci bir tedavi sürecine ihtiyaç duydukları ve bu nedenle Kadın doğum uzmanlarına tekrar başvurdukları görülmüştür. Bu oran tedavi olan hastaların % 50' sinden daha fazlasını oluşturmaktadır. Aynı zamanda gebe ve yüksek risk grubu hastalarda kimyasal antifungallerin yan etkileri de göz ardı edilmemelidir. Özellikle antibiyotik tedavisi sonrası gebe hastalarda vajinal kandidiyaz sıklığı daha sıktır (Denning ve diğ, 2018). Buna ek olarak, gebelik durumunda vajinal sekresyonlardaki yüksek östrojen ve glikojen seviyeleri, vajinal kandidiyaz gelişme riskini artırmaktadır (Monif ve Baker, 2003).

Vajinal kandidiyaz genellikle oral antifungal tedavi ile tedavi edilmektedir. Ancak bazı çalışmalarda tanımlanan kronik bir alt tipin tedavisi daha zor olabilmekte ve intravajinal ilaçlarla desteklenmesi gerekebilmektedir (Hong ve diğ, 2014; Fischer, 2012). Bu durumda mevcut literatür değerlendirildiğinde, doku yüzeyine iyi yapışan Mikrobiyal KS yapısal özellikleri nedeniyle intravajinal tedavi için iyi bir alternatif olma potansiyelindedir. Vajinal mikroflorada baskın olarak görülen *Lactobacillus* türlerinin patojenik mikroorganizmalara karşı vajinal epitel yüzeye yapışıp tüm yüzeyi kaplayarak koruma mekanizması oluşturduğu belirtilmiştir (Mastromarino ve diğ, 2014; Kwok ve diğ, 2006). Bu çalışmaya göre, tezimizde Mikrobiyal KS'nin adezyon ve difüzyonu kolaylaştırıcı özellikleri ile *Lactobacillus*'ların sağladığı bu mekanizmayı destekleyebileceğini kanıtlayan veriler elde edilmiştir.

Kondroitin sülfat ekstraselüler matrikste mevcuttur ancak bu miktar *Candida* enfeksiyonunu tedavi edemeyecek kadar düşüktür. Yapılan araştırmalardaki bulgular menapoz sonrası kadınların vajinal dokularındaki Kondroitin Sülfatın ve bazı GAG'ların sağlıklı üreme çağındaki kadınlara göre azaldığını göstermektedir (Bezerra ve diğ., 2004). Aynı zamanda vajinal kuruluk ve sağlıklı vajinal dokunun anormalleşmesiyle meydana gelen patolojik durumlarda KS'nin olumlu yönde etkinliği gözlenmiştir (Torella ve diğ., 2016). Bununla birlikte östrojen hormonlarının kadınlarda vajinal epitelinin büyümesini ve olgunlaşmasını desteklediğini ve KS gibi GAG'ların sentezini sağladığı bilinmektedir (Orazov ve diğ., 2020; Tyuzikov ve diğ., 2018). Östrojenlerin mesanenin ürotelyumundaki GAG'ların sentezini, herhangi bir anormallik veya komplikasyon sonucunda olumsuz yönde etkilemesi vajinal dokudaki ECM'de bulunan KS'lerde bir orantısızlık oluşturabilmekte ve buda ciddi sağlık sorunlarıyla sonuçlanabilmektedir. Tüm bunlar düşünüldüğünde Mikrobiyal KS'nin prebiyotik bir ajan olarak kullanılabilirliği sadece antifungal etkisiyle ilişkili değil aynı zamanda vajinal doku bütünlüğünün de devamı için de gerekli olabilmektedir.

Sonuç olarak, Mikrobiyal KS'nin vajinal enfeksiyonunu oluşturabilecek patojenik mikroorganizmalara karşı tedaviyi destekleyici etkin bir terapötik ajan olarak kullanılabilmesi konusunda anlamlı sonuçlar elde etmiş bulunmaktayız. Mikrobiyal KS doğal, toksik olmayan ve biyouyumlu yapısı ile vajinal kandidiyaziste kullanılan diğer antifungal ajanlarla kıyasla herhangi bir yan etki göstermemektedir. Bu özelliği ile kimyasal antifungal ajanları kullanamayan gebe ve yüksek risk grubu hastalarda önemli bir tedavi ajanı potansiyelindedir. Mikrobiyal KS, helal ve vegan özellikleri ile biyoteknolojik ilaç endüstrisinde önemli bir ürün olarak yer bulabilecektir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kondroitin sülfat  $\beta$ -1,3 glikozidik bağlarla bağlanmış ve farklı karbon pozisyonlarında sülfatlanmış glukuronik asit (GlcA) ve *N*-asetil-galaktozamin (GalNAc) disakkarit birimlerinden oluşan polimerik bir karbonhidrattır. Kondroitin sülfatın sınıflandırılması sülfat grubunun bulunduğu yere bağlı olarak yapılmaktadır. Yaptığımız bu çalışmada, daha etkin olacağını düşündüğümüz *N*-asetil-galaktozamin üzerinde 6. karbonun sülfatlanmasıyla Kondroitin Sülfat-C (KS-C) formu oluşturulmuş ve bu formun antifungal etkinliği ile birlikte her bir mantar türü için MİK değerleri belirlenmiştir.

Yaptığımız tez çalışmamızda, genelde tüm mantar hastalıklarının, özelde ise vajinal kandidiyazisin nedeni olan en baskın mantar türlerinden *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei*'ye karşı Mikrobiyal KS'nin antifungal etkinliği, agar dilüsyon ve resazurin-temelli broth dilüsyon yöntemleri kullanılarak ispatlanmıştır. Dolayısıyla çalışmamız sonucunda, antifungal etkinliği kanıtlanmış olan Mikrobiyal KS nin, vajinal enfeksiyonlarda yaygın olarak tesbit edilen vajinal kandidiyazisi tedavisini desteklemek yada klinik tablo belirginleşmeden önce vajinal kandidiyazisi önleyici olarak kullanılabileceği öngörülmüştür. Yeni bir rekombinant suş olan *E. coli* (pETM6-PACF-*vgb*) bakterisinin Kondroitin Sülfat üretme özelliği kullanılarak elde edilen Mikrobiyal KS krem formda intravajinal olarak uygulanabilir yada aynı zamanda suda kolay eriyebilirliği ve nemli ortamda jel kıvamında bulunması gibi özellikleri de bulunduğundan tablet formda prebiyotik olarak da kullanılabileceği düşünülmektedir.

İmidazol, triazol ve polien antifungaller vajinal kandidiyazisi tedavisinde intravajinal veya oral olarak kullanılan ilaçlardır. Candidal enfeksiyonların tedavisi için antifungal ilaçlarla gerçekleştirilen tedavi süreci uzun zaman almakta bu da hem hastanın hayat standartlarının düşmesine sebep olmakta hemde ekonomik yönden külfet oluşturmaktadır. *Candida albicans* ve non-*albicans Candida* türleri için bu tablo daha da ağırlaşabilmektedir. Yaptığımız bu çalışmada etken maddesinin Mikrobiyal KS olduğu üretilebilecek tedavi ajanlarının hem uzun vadeli tedavi sürecini azaltabileceği hem de hastanın bu anlamda hayat konforunu yükseltebileceği düşünülmüştür.

Yapılacak olan ileri çalışmalarda, Mikrobiyal KS'nin sadece vajinal kandidiyazis için değil aynı zamanda deri ve mukozal enfeksiyonlara neden olabilecek diğer *Candida* enfeksiyonları içinde potansiyel tedavi destek ajanı olarak da kullanılabilceği düşünülebilir ve çalışmalar bu yönde geliştirilebilir. Aynı zamanda etken madde olarak kullanılacak olan Mikrobiyal KS, kullanılacak vücut mukozal bölgesine göre çeşitli prebiyotik yardımcı maddelerle mix yapılarak oluşturulabilecek yeni bir tedavi ajanı olarak geliştirilebilecek potansiyelindedir.

Vajinal kandidiyaz tedavisi için dünya çapında milyonlarca dolar harcanmaktadır. Hastaların hastanede tedavisi, daha fazla antifungal ilaç kullanımına ve yanı sıra hastanın açısından psikolojik etkilere ve çalışma hayatında işgücü kaybına yol açmaktadır. Tedavi için Mikrobiyal KS kullanımının ekonomik bir değeri olacağı ayrıca hastayı antifungal ilaçların yan etkilerinden koruyabileceği ön görülmektedir. Türkiye İlaç Sektörü önemli miktarlarda ve çeşitlilikte üretim ve ihracat olanağına sahip ve katma değeri yüksek olan sektörlerden biridir. Uluslararası norm ve standartların uygulandığı Türkiye İlaç Sektörü, Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenen "İyi Üretim Uygulamaları" çerçevesinde gerekli yatırımları yaparak teknolojik alt yapısını güçlendirmiştir. Dünyada sentez kimyasıyla üretilen ürünler gittikçe azalmakta, ilaç pazarında Biyoteknolojik yaklaşımlar ağırlık kazanmaktadır.. Ülkemizde de dünyadaki gelişmelere paralel olarak biyoteknolojik ilaçların üretimi önem kazanmaktadır. Keşfedilen yeni ilaç kimyasallarının sayısı azalmaktadır. Buna karşın, biyoteknolojik ilaçlar günümüzde toplam ilaç pazarının %29'unu oluşturmakla birlikte, yakın gelecekte %35'ini oluşturması beklenmektedir. 2019 yılında 266 milyar \$ olarak bildirilen biyoteknolojik ilaç satışlarının, 2026 yılında 505 milyar \$'a ulaşacağı değerlendirilmektedir (İlaç Sektörü Raporu, 2020). Mikrobiyal KS'nin, kandidal enfeksiyonların tedavisi için kullanılabilcek biyoteknolojik ilaçlar kategorisinde yer alabileceği ve bu noktada kimyasal ajanların oluşturdukları olumsuzlukları ortadan kaldıracabileceği düşünülmektedir. Ekibimiz tarafından üretilen ve osteoartritteki etkinliği deneysel hayvan çalışmaları ile kanıtlanan Mikrobiyal KS'nin Kandidal enfeksiyonlardaki etkinliğinin de Deneysel hayvan modeli ile kanıtlanması bir gerekliliktir. Bu aşamada elde edilecek başarı, üretimimiz olan MKS'nin yerli ve milli bir biyoteknolojik ilaç olarak kullanımının yolunu açacaktır. Tezimiz, dünya literatüründe MKS'nin antifungal ajan etkinliğinin tartışıldığı ilk çalışma olma niteliği taşımaktadır. Bu yaklaşımın deneysel hayvan çalışması sonrası bir ürüne dönüşmesi en önemli hedefimizdir.

## KAYNAKLAR

- Abbas, J., Bodey, G. P., Hanna, H. A., Mardani, M., Girgawy, E., Abi-Said, D., Whimbey, E., Hachem, R. & Raab, I. (2000). *Candida krusei* fungemia: an escalating serious infection in immunocompromised patients, *Archives of Internal Medicine*, 1602659-2664.
- Abi-Said, D., Anaissie, E., Uzum, O., Raad, I., Pinzcowski, H. & Vartivarian, S. (1997). The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species, *Clinical Infectious Diseases*, 241122-1128.
- Aguilar-Zapata, D., Petraitiene, R., & Petraitis, V. (2015). Echinocandins: The Expanding Antifungal Armamentarium. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 61 Suppl 6, S604–S611.
- Agustinho, D. P., Miller, L. C., Li, L. X., & Doering, T. L. (2018). Peeling the onion: the outer layers of *Cryptococcus neoformans*, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(7), e180040.
- Akgün, I., Öğüt, T., (2002). Oral Glukozamin ve Kondroitin Sülfatın Osteoartrit Tedavideki Yeri, *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi*, 1(2), 66-70.
- Akpınar, D. & Kılıç, G. B. (2012). Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Antifungal Bileşenler, *Gıda*, 37 (1), 47-54.
- Aldunate, M., Srbinovski, D., Hearps, A. C., Latham, C. F., Ramsland, P. A., Gugasyan, R., Cone, R. A., & Tachedjian, G. (2015). Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis, *Frontiers in physiology*, 6, 164.
- Aldunate, M., Tyssen, D., Johnson, A., Zakir, T., Sonza, S., Moench, T., Cone, R., & Tachedjian, G. (2013). Vaginal concentrations of lactic acid potentially inactivate HIV, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(9), 2015–2025.
- Anderson, D. J., Marathe, J., & Pudney, J. (2014). The structure of the human vaginal stratum corneum and its role in immune defense, *American journal of reproductive immunology*, 71(6), 618–623.
- Andrews, S. C., Shipley, D., Keen, J. N., Findlay, J. B., Harrison, P. M., & Guest, J. R. (1992). The haemoglobin-like protein (HMP) of *Escherichia coli* has ferrisiderophore reductase activity and its C-terminal domain shares homology with ferredoxin NADP<sup>+</sup> reductases, *FEBS letters*, 302(3), 247–252.

- Anukam, K. C. & Reid G. (2007). Lactobacillus plantarum and Lactobacillus fermentum with probiotic potentials isolated from the vagina of healthy Nigerian women, *Research Journal of Microbiology*, 2, 81-87
- Araújo, D., Henriques, M., & Silva, S. (2017). Portrait of Candida Species Biofilm Regulatory Network Genes. *Trends in microbiology*, 25(1), 62–75.
- Aryal, S. (2021). Microbe Notes, Erişim: 3.12.2021, <https://microbenotes.com/candidiasis/>
- Badri, A., Williams, A., Awofiranye, A., Datta, P., Xia, K., He, W., Fraser, K., Dordick, J. S., Linhardt, R. J. & Koffas, M.A.G. (2021). Complete biosynthesis of a sulfated chondroitin in Escherichia coli, *Nature Communications*, 12:1389
- Bai, X., Zhou, D., Brown, J. R., Crawford, B. E., Hennes, T., & Esko, J. D. (2001). Biosynthesis of the linkage region of glycosaminoglycans: cloning and activity of galactosyltransferase II, the sixth member of the beta 1,3-galactosyltransferase family (beta 3GalT6), *The Journal of biological chemistry*, 276(51), 48189–48195.
- Bartlett, J. G., Onderdonk, A. B., Drude, E., Goldstein, C., Anderka, M., Alpert, S., & McCormack, W. M. (1977). Quantitative bacteriology of the vaginal flora, *The Journal of infectious diseases*, 136(2), 271–277.
- Bayliss, M. T., Osborne, D., Woodhouse, S., & Davidson, C. (1999). Sulfation of chondroitin sulfate in human articular cartilage. The effect of age, topographical position, and zone of cartilage on tissue composition, *The Journal of biological chemistry*, 274(22), 15892–15900.
- Beamer, M. A., Austin, M. N., Avolia, H. A., Meyn, L. A., Bunge, K. E., & Hillier, S. L. (2017). Bacterial species colonizing the vagina of healthy women are not associated with race, *Anaerobe*, 45, 40–43.
- Benedict, K., Jackson, B. R., Chiller, T., & Beer, K. D. (2019). Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States, *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 68(11), 1791–1797.
- Bezerra, L. R., Feldner, P. C., Jr, Kati, L. M., Girão, M. J., Sartori, M. G., Baracat, E. C., de Lima, G. R., Nader, H. B., & Dietrich, C. P. (2004). Sulfated glycosaminoglycans of the vagina and perineal skin in pre- and postmenopausal women, according to genital prolapse stage, *International urogynecology journal and pelvic floor dysfunction*, 15(4), 266–271.
- Biruni Laboratuvarı. (2016). Chlamydia trachomatis, Erişim: 25 Kasım 2021, <https://biruni.com.tr/e-kutuphane/bilimsel-bultenler/chlamydia-trachomatis-06-10-2016/>
- Bobula, T., Buffa, R., Hermannová, M., Vágnerová, H., Dolečková, I., & Velebný, V. (2018). The synthesis of a new unsaturated derivative of chondroitin sulfate with increased antioxidant properties, *Carbohydrate polymers*, 190, 175–183.
- Boerman, S.J. & D.A. Webster, (1982). Control of heme content in Vitreoscilla by oxygen, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 28(1), 35-43.
- Boris, S., & Barbés, C. (2000). Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens, *Microbes and infection*, 2(5), 543–546.

- Bougatef, H., Krichena, F., Capitanib, F., Amorci, I. B., Maccarib, F., Mantovanib, V., Galeottib, F., Volpib, N., Bougatefa, A. & Silaa, A. (2018). Chondroitin sulfate/dermatan sulfate from corb (*Sciaena umbra*) skin: Purification, structural analysis and anticoagulant effect, *Carbohydrate Polymers*, *196*, 272–278.
- Brotman R. M. (2011). Vaginal microbiome and sexually transmitted infections: an epidemiologic perspective. *The Journal of clinical investigation*, *121*(12), 4610–4617.
- Bülow, L., Holmberg, N., Lilius, G., & Bailey, J. E. (1999). The metabolic effects of native and transgenic hemoglobins on plants, *Trends in biotechnology*, *17*(1), 21–24.
- Cañas, N., Gorina, R., Planas, A. M., Vergés, J., Montell, E., García, A. G., & López, M. G. (2010). Chondroitin sulfate inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in rat astrocytes by preventing nuclear factor kappa B activation, *Neuroscience*, *167*(3), 872–879.
- Casale, J., & Crane, J. S. (2021). Biochemistry, Glycosaminoglycans. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Ceccarani, C., Foschi, C., Parolin, C., D'Antuono, A., Gaspari, V., Consolandi, C., Laghi, L., Camboni, T., Vitali, B., Severgnini, M., & Marangoni, A. (2019). Diversity of vaginal microbiome and metabolome during genital infections, *Scientific reports*, *9*(1), 14095.
- Cherpes, T. L., Meyn, L. A., Krohn, M. A., Lurie, J. G., & Hillier, S. L. (2003). Association between acquisition of herpes simplex virus type 2 in women and bacterial vaginosis, *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *37*(3), 319–325.
- Chung, J. Y., Wilkie, I., Boyce, J. D., Townsend, K. M., Frost, A. J., Ghoddusi, M., & Adler, B. (2001). Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A, *Infection and immunity*, *69*(4), 2487–2492.
- Clemons, J. L., Arya, L. A., & Myers, D. L. (2002). Diagnosing interstitial cystitis in women with chronic pelvic pain, *Obstetrics and gynecology*, *100*(2), 337–341.
- Collins, M. D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J. A. E., MartinezMurcia, A., Phillips, B. A., Williams, A. M., & Wallbanks, S. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA, *FEMS Microbiology Letters*, *77*(1), 5–12.
- Cotch, M. F., Pastorek, J. G., 2nd, Nugent, R. P., Hillier, S. L., Gibbs, R. S., Martin, D. H., Eschenbach, D. A., Edelman, R., Carey, J. C., Regan, J. A., Krohn, M. A., Klebanoff, M. A., Rao, A. V., & Rhoads, G. G. (1997). *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group, *Sexually transmitted diseases*, *24*(6), 353–360.
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature reviews. Microbiology*, *3*(10), 777–788.

- Coudeyras, S., Jugie, G., Vermerie, M., & Forestier, C. (2008). Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis-associated pathogens. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 2008, 549640.
- Couture, M., Yeh, S. R., Wittenberg, B. A., Wittenberg, J. B., Ouellet, Y., Rousseau, D. L., & Guertin, M. (1999). A cooperative oxygen-binding hemoglobin from *Mycobacterium tuberculosis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11223–11228.
- Cowen, L. E., Sanglard, D., Howard, S. J., Rogers, P. D., & Perlin, D. S. (2014). Mechanisms of Antifungal Drug Resistance, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(7), a019752.
- Cribby, S., Taylor, M., & Reid, G. (2008). Vaginal microbiota and the use of probiotics, *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2008, 256490.
- Cruciani, F., Biagi, E., Severgnini, M., Consolandi, C., Calanni, F., Donders, G., Brigidi, P., & Vitali, B. (2015). Development of a microarray-based tool to characterize vaginal bacterial fluctuations and application to a novel antibiotic treatment for bacterial vaginosis, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(5), 2825–2834.
- Curtis, A. H. (1913). A motile curved anaerobic bacillus in uterine discharges, *The Journal of Infectious Diseases*, 165-169.
- DeAngelis, P. L., & Padgett-McCue, A. J. (2000). Identification and molecular cloning of a chondroitin synthase from *Pasteurella multocida* type F. *The Journal of biological chemistry*, 275(31), 24124–24129.
- Delarze, E., Brandt, L., Trachsel, E., Patxot, M., Pralong, C., Maranzano, F., Chauvel, M., Legrand, M., Znaidi, S., Bougnoux, M. E., d'Enfert, C., & Sanglard, D. (2020). Identification and Characterization of Mediators of Fluconazole Tolerance in *Candida albicans*, *Frontiers in microbiology*, 11, 591140.
- Denning, D. W., Kneale, M., Sobel, J. D., & Rautemaa-Richardson, R. (2018). Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review, *The Lancet. Infectious diseases*, 18(11), e339–e347.
- Deorukhkar, S. C., Saini, S., & Mathew, S. (2014). Non-albicans *Candida* Infection: An Emerging Threat, *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2014, 615958.
- Dikshit, K. L., & Webster, D. A. (1988). Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*. *Gene*, 70(2), 377–386.
- Dimitonova, S. P., Danova, S. T., Serkedjieva, J. P., & Bakalov, B. V. (2007). Antimicrobial activity and protective properties of vaginal lactobacilli from healthy Bulgarian women, *Anaerobe*, 13(5-6), 178–184.
- Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait?, *Applied and environmental microbiology*, 78(1), 1–6.
- Döderlein, A. (1892). Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber, *Besold*, Leipzig.

- Drago, M., Scaltrio, M. M., Morace, G. & the GISIA-2 Group. (2004). In vitro activity of voriconazole and other antifungal agents against clinical isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 23619-624.
- DRG International Inc. (2009). Chromagar, Erişim: 25 Kasım 2021, [http://www.chromagar.com/p-hromogenic\\_agar\\_Technology.html#](http://www.chromagar.com/p-hromogenic_agar_Technology.html#). YaqUg NDP3IU
- Du Plessis, E. M., & Dicks, L. M. (1995). Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, and *Lactobacillus johnsonii*, *Current Microbiology*, 31(2), 114-118.
- Eisenman, H. C., & Casadevall, A. (2012). Synthesis and assembly of fungal melanin, *Applied microbiology and biotechnology*, 93(3), 931–940.
- Elmendorf, H. G., Hayes, R. D., Srivastava, S., Johnson, P. (2010). New insights into the composition and function of the cytoskeleton. In C.G. Clark, P. Johnson, R.D. Adam (Eds), *Giardia lamblia and Trichomonas vaginalis* (pp. 19–156). Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.
- Erben, N. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. (2018). *Güncel Antifungal Tedavi Yönetimi* [PowerPoint slides]. Retrieved from [https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fekmud.org.tr%2Fsunum%2Findir%2F914-guncel-antifungal-tedavi-yonetimi&psig=AOvVaw2nFk7Khbyir\\_D4Ce3V9pli&ust=1641495695902000&source=images&cd=vfe&ved=0CAsQjRxqFwoTCJjXqZSmm\\_UCFQAAAAAdAAAAABAI](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fekmud.org.tr%2Fsunum%2Findir%2F914-guncel-antifungal-tedavi-yonetimi&psig=AOvVaw2nFk7Khbyir_D4Ce3V9pli&ust=1641495695902000&source=images&cd=vfe&ved=0CAsQjRxqFwoTCJjXqZSmm_UCFQAAAAAdAAAAABAI)
- Erenler, A. S., (2019). Capsular Polysaccharide Biosynthesis from Recombinant *E. coli* and Chondroitin Sülfate Production, *Cellular and molecular biology*, 65(6), 17–21.
- Erenler, A. S., Geckil, H., Karabulut, A. B., Akpolat, N., Sevimli, R., Ulke, E., Aliyeva, A. (2019). Cloning and Expression *vgb-kfo* Genes in *E. coli* and Microbial Chondroitin Sulfate Production, *Science of Advanced Materials*, 11(12), 1745-1754.
- Erenler, A. S., Bay Karabulut, A., Sevimli, R., Geckil, H., Akpolat, N., Unver, T. & Otlu O. (2022). Biochemical Effect Evaluation of Microbial Chondroitin Sulphate in Experimental Knee Osteoarthritis Model, *Fresenius Environmental Bulletin*, 31(1), 510-517.
- Erin, L., Stephenson, V. & Yong, W. (2018). Pro-inflammatory roles of chondroitin sulfate proteoglycans in disorders of the central nervous system, *Matrix Biology*, 71–72, 432-442.
- Erkekoğlu, P. & Baydar, T. (2021). Güncel in Vitro Sitotoksitate Testleri, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 41(1), 45-63.
- Erkmen, O. & Bozoğlu, T. F. (2008a). Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds. Food Microbiology 3 Food Preservation. İlke Yayınevi, Ankara, Türkiye, s. 71-124.

- Erkmen, O. & Bozoğlu, T. F. (2008b). *Food Microbiology 4 Beneficial Uses of Microorganisms for Food Preservation and Health*. İlke Yayınevi, Ankara, Türkiye, s. 39-49.
- Erwig, L. P., & Gow, N. A. (2016). Interactions of fungal pathogens with phagocytes, *Nature Reviews Microbiology*, 14(3), 163-176.
- Eryilmaz, M., Gurpinar, S. S., Palabiyik, I. M., Guriz, H., & Gerceker, D. (2018). Molecular Identification and Antimicrobial Activity of Vaginal Lactobacillus sp, *Current pharmaceutical biotechnology*, 19(15), 1241–1247.
- Fidel, P. L., Jr, Vazquez, J. A., & Sobel, J. D. (1999). Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to C. albicans, *Clinical microbiology reviews*, 12(1), 80–96.
- Fischer, G. (2012). Chronic vulvovaginal candidiasis: what we know and what we have yet to learn. *The Australasian journal of dermatology*, 53(4), 247–254.
- Florou-Paneri, P., Christaki, E. & Bonos, E. (2013). Lactic acid bacteria as source of functional ingredients. In J. M. Kongo (Eds.), *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes* (25, pp.589-614). InTech.
- Fong I. W. (1996). Clinical and cost considerations in the pharmacotherapy of vulvovaginal candidiasis. *PharmacoEconomics*, 9(6), 497–505.
- Fujisaki, M. (2020) Bacterial Vaginosis. In H. Sameshima (Eds.), *Preterm Labor and Delivery. Comprehensive Gynecology and Obstetrics* (pp. 175-180). Springer, Singapore.
- Funderburgh J. L. (2002). Keratan sulfate biosynthesis, *IUBMB life*, 54(4), 187–194.
- Funderburgh, J. L. (2000). Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function, *Glycobiology*, 10(10), 951–958.
- Gajer, P., Brotman, R. M., Bai, G., Sakamoto, J., Schütte, U. M., Zhong, X., Koenig, S. S., Fu, L., Ma, Z. S., Zhou, X., Abdo, Z., Forney, L. J., & Ravel, J. (2012). Temporal dynamics of the human vaginal microbiota, *Science translational medicine*, 4(132), 132ra52.
- Galask, R. P., Larsen, B., & Ohm, M. J. (1976). Vaginal flora and its role in disease entities, *Clinical obstetrics and gynecology*, 19(1), 61–81.
- Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., & Trevijano-Contador, N. (2020). The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species, *Frontiers in microbiology*, 10, 2993.
- Gardner, H. L. & Dukes, C. D. (1955). Haemophilis vaginalis vaginitis, *The American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 69,962-72.
- Garnjanagoonchorn, W., Wongekalak, L. & Engkagul, A., (2007). Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(5), 465– 471.
- Gaspar, C., Donders, G. G., Palmeira-de-Oliveira, R., Queiroz, J. A., Tomaz, C., Martinez-de-Oliveira, J., & Palmeira-de-Oliveira, A. (2018). Bacteriocin production of the probiotic Lactobacillus acidophilus KS400, *AMB Express*, 8(1), 153.

- Gencay, M., Koskiniemi, M., Fellman, V., Ammala, P., Vaheri, A., & Puolakkainen, M. (2001). Chlamydia trachomatis infection in mothers with preterm delivery and in their newborn infants, *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 109(9), 636–640.
- Gencay, M., Puolakkainen, M., Wahlström, T., Ammälä, P., Mannonen, L., Vaheri, A., & Koskiniemi, M. L. (1997). Chlamydia trachomatis detected in human placenta, *Journal of clinical pathology*, 50(10), 852–855.
- Gerdin, B., & Hällgren, R. (1997). Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation, *Journal of internal medicine*, 242(1), 49–55.
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance, *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 501–517. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.501>
- Giuliani, A., Pirri, G., & Rinaldi, A. C. (2010). Antimicrobial peptides: the LPS connection, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 618, 137–154.
- Gong, Z., Luna, Y., Yu, P., & Fan, H. (2014). Lactobacilli inactivate Chlamydia trachomatis through lactic acid but not H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *PloS one*, 9(9), e107758.
- González-Pinzón, R., Haggerty, R. & Myrold, D. D. (2012). Measuring aerobic respiration in stream ecosystems using the resazurin-resorufin system, *Journal of Geophysical Research*, 117, G00N06 1-10.
- Gonzalez-Robles, A., Lázaro-Haller, A., Espinosa-Cantellano, M., Anaya-Velázquez, F., & Martínez-Palomo, A. (1995). Trichomonas vaginalis: ultrastructural bases of the cytopathic effect, *The Journal of eukaryotic microbiology*, 42(5), 641–651.
- Gopal, P.K. (2011). Lactic Acid Bacteria | Lactobacillus spp.: Lactobacillus acidophilus, In: J.W. Fuquay (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd ed., pp. 91-95). Mississippi: Academic Press.
- Goplerud, C. P., Ohm, M. J., & Galask, R. P. (1976). Aerobic and anaerobic flora of the cervix during pregnancy and the puerperium, *American journal of obstetrics and gynecology*, 126(7), 858–868.
- Gorbach, S. L., Menda, K. B., Thadepalli, H., & Keith, L. (1973). Anaerobic microflora of the cervix in healthy women, *American journal of obstetrics and gynecology*, 117(8), 1053–1055.
- Gow, N., Latge, J. P., & Munro, C. A. (2017). The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function, *Microbiology spectrum*, 5(3), 10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016.
- Gram, I. T., Macaluso, M., Churchill, J., & Stalsberg, H. (1992). Trichomonas vaginalis (TV) and human papillomavirus (HPV) infection and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade III, *Cancer causes & control : CCC*, 3(3), 231–236.
- Gülel, Ş. (2014). *Molecular identification and probiotic properties of 'lactobacillus acidophilus group' isolates from turkish kefir* (Master's thesis). Retrieved from <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>

- Guo, J., Xu, Q., Shi, R., Zheng, Z., Mao, H., & Yan, F. (2017). Polyanionic Antimicrobial Membranes: An Experimental and Theoretical Study. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, *33*(17), 4346–4355.
- Gupta, K., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Roberts, P. L., Fennell, C. L., & Stamm, W. E. (1998). Inverse association of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing lactobacilli and vaginal *Escherichia coli* colonization in women with recurrent urinary tract infections, *The Journal of infectious diseases*, *178*(2), 446–450.
- Haggerty, C. L., Gottlieb, S. L., Taylor, B. D., Low, N., Xu, F., & Ness, R. B. (2010). Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis* genital infection in women, *The Journal of infectious diseases*, *201 Suppl 2*, S134–S155.
- Happy Science. (2021). Erişim: 28 Kasım 2021, <https://d13ecnd8k9ud7e.cloudfront.net/wp-content/uploads/2021/03/Candida-albicans-smear.jpg>
- Hardy, P. H., Hardy, J. B., Nell, E. E., Graham, D. A., Spence, M. R., & Rosenbaum, R. C. (1984). Prevalence of six sexually transmitted disease agents among pregnant inner-city adolescents and pregnancy outcome, *Lancet (London, England)*, *2*(8398), 333–337.
- He, W., Fu, L., Li, G., Andrew Jones, J., Linhardt, R. J., & Koffas, M. (2015). Production of chondroitin in metabolically engineered *E. coli*, *Metabolic engineering*, *27*, 92–100.
- He, X., Yang, Y., Song, H., Wang, S., Zhao, H., & Wei, D. (2020). Polyanionic Composite Membranes Based on Bacterial Cellulose and Amino Acid for Antimicrobial Application. *ACS applied materials & interfaces*, *12*(13), 14784–14796.
- Hector R. F. (1993). Compounds active against cell walls of medically important fungi, *Clinical microbiology reviews*, *6*(1), 1–21.
- Henrotin, Y., Mathy, M., Sanchez, C., & Lambert, C. (2010). Chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: from in vitro studies to clinical recommendations. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, *2*(6), 335–348.
- Hensiek, R., Krupp, G., & Stackebrandt, E. (1992). Development of diagnostic oligonucleotide probes for four *Lactobacillus* species occurring in the intestinal tract, *Systematic and Applied Microbiology*, *15*(1), 123-128.
- Herget, S., Toukach, P. V., Ranzinger, R., Hull, W. E., Knirel, Y. A., & von der Lieth, C. W. (2008). Statistical analysis of the Bacterial Carbohydrate Structure Data Base (BCSDB): characteristics and diversity of bacterial carbohydrates in comparison with mammalian glycans. *BMC structural biology*, *8*, 35.
- Hertel, C., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K., & Schleifer, K. H. (1993). Differentiation of lactobacilli occurring in fermented milk products by using oligonucleotide probes and electrophoretic protein profiles, *Systematic and Applied Microbiology*, *16*(3), 463-467.
- Hill, G. B. (1980) Anaerobic flora of the female genital tract. In: D.W. Lambe, R.J. Genco, K.J. Mayberry Carson (Eds.), *Anaerobic bacteria, selected topics* (pp. 39–50). New York: Plenum Press.

- Holmberg, N., Lilius, G., Bailey, J. E., & Bülow, L. (1997). Transgenic tobacco expressing Vitreoscilla hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production, *Nature biotechnology*, 15(3), 244–247.
- Holzapfel, W. H., Geisen, R., & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes, *International journal of food microbiology*, 24(3), 343–362.
- Homayouni, A., Bastani, P., Ziyadi, S., Mohammad-Alizadeh-Charandabi, S., Ghalibaf, M., Mortazavian, A. M., & Mehrabany, E. V. (2014). Effects of probiotics on the recurrence of bacterial vaginosis: a review, *Journal of lower genital tract disease*, 18(1), 79–86.
- Hong, E., Dixit, S., Fidel, P. L., Bradford, J., & Fischer, G. (2014). Vulvovaginal candidiasis as a chronic disease: diagnostic criteria and definition, *Journal of lower genital tract disease*, 18(1), 31–38.
- Iijima, M., Shimizu, H., Tanaka, Y., & Urushihara, H. (2000). Identification and characterization of two flavohemoglobin genes in *Dictyostelium discoideum*, *Cell structure and function*, 25(1), 47–55.
- İlaç Sektörü Raporu (2020). Sektörel Raporlar ve Analizler Serisi, Sanayi Ve Verimlilik Genel Müdürlüğü, TC Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, [https://www.sanayi.gov.tr/assets/pdf/plan-program/IlacSektorRaporu\(2020\).pdf](https://www.sanayi.gov.tr/assets/pdf/plan-program/IlacSektorRaporu(2020).pdf)
- Ilkit, M., & Guzel, A. B. (2011). The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. *Critical reviews in microbiology*, 37(3), 250–261.
- Jakobsson, T., & Forsum, U. (2007). *Lactobacillus iners*: a marker of changes in the vaginal flora?, *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 3145.
- Jeanmonod, R. & Jeanmonod, D. (2019). Vaginal Candidiasis (Vulvovaginal Candidiasis). In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Johnson, J. L., Phelps, C. F., Cummins, C. S., London, J., & Gasser, F. (1980). Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30(1), 53–68.
- Jolly J.F., Klimaszewski, K., Nakanishi, Y., Matsubara, H., Takahashi, T. & Nishio, K. Microbial-derived chondroitin sulfate, US Patent 2010/0063001, A1, Mar. 11, 2010.
- Kaewnopparat, S., Dangmanee, N., Kaewnopparat, N., Srichana, T., Chulasiri, M., & Settharaksa, S. (2013). In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman, *Anaerobe*, 22, 6–13.
- Kaewsrichan, J., Peeyananjarassri, K. & Kongprasertkit, J. (2006). Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 48(1):75–83.
- Kalaiarasan, K., Singh, R., & Chaturvedula, L. (2017). Fungal Profile of Vulvovaginal Candidiasis in a Tertiary Care Hospital, *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 11(3), DC06–DC09.

- Kalyoussef, S., Nieves, E., Dinerman, E., Carpenter, C., Shankar, V., Oh, J., Burd, B., Angeletti, R. H., Buckheit, K. W., Fredricks, D. N., Madan, R. P., Keller, M. J., & Herold, B. C. (2012). Lactobacillus proteins are associated with the bactericidal activity against *E. coli* of female genital tract secretions, *PloS one*, 7(11), e49506.
- Kamga, Y. M., Ngunde, J. P., & Akoachere, J. (2019). Prevalence of bacterial vaginosis and associated risk factors in pregnant women receiving antenatal care at the Kumba Health District (KHD), Cameroon. *BMC pregnancy and childbirth*, 19(1), 166.
- Karakoç, Z. Ç. (2019). Epidemiology of invasive fungal infections, *Klimik Dergisi*, 32(2), 118-23.
- Karpiński, T. M. & Szkaradkiewicz, A.K. (2016). Bacteriocins. In B. Caballero, P. M. Finglas, F. Toldrá, (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, (pp.312-319) Retrieved from <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00053-2>.
- Katragkou, A., Fisher, B. T., Groll, A. H., Roilides, E., & Walsh, T. J. (2017). Diagnostic Imaging and Invasive Fungal Diseases in Children, *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 6(suppl\_1), S22–S31.
- Kaur, B., Balgir, P., Mittu, B., Chauhan, A., Kumar B., (2013). Purification and physicochemical characterization of anti-gardnerella vaginalis bacteriocin hv6b produced by *Lactobacillus fermentum* isolate from human vaginal ecosystem, *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(1), 91-100.
- Khosla, C., & Bailey, J. E. (1988). The Vitreoscilla hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli*, *Molecular & general genetics: MGG*, 214(1), 158–161.
- Khosla, C., & Bailey, J. E. (1989). Evidence for partial export of Vitreoscilla hemoglobin into the periplasmic space in *Escherichia coli*, *Implications for protein function. Journal of molecular biology*, 210(1), 79–89.
- Kindinger, L. M., Bennett, P. R., Lee, Y. S., Marchesi, J. R., Smith, A., Cacciatore, S., Holmes, E., Nicholson, J. K., Teoh, T. G., & MacIntyre, D. A. (2017). The interaction between vaginal microbiota, cervical length, and vaginal progesterone treatment for preterm birth risk, *Microbiome*, 5(1), 6.
- Kitagawa, H., Tone, Y., Tamura, J., Neumann, K. W., Ogawa, T., Oka, S., Kawasaki, T., & Sugahara, K. (1998). Molecular cloning and expression of glucuronyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans, *The Journal of biological chemistry*, 273(12), 6615–6618.
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS microbiology reviews*, 12(1-3), 39–85.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., & Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 103-125.

- Koumans, E. H., Sternberg, M., Bruce, C., McQuillan, G., Kendrick, J., Sutton, M., & Markowitz, L. E. (2007). The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health, *Sexually transmitted diseases*, 34(11), 864–869.
- Krcmery, V., & Barnes, A. J. (2002). Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance, *The Journal of hospital infection*, 50(4), 243–260.
- Krönig, B. (1895). Über die Natur der Scheidenkeime, speciell über das Vorkommen anaerober Streptokokken im scheidensekret Schwangerer, *Centrbl Gynäkol*, 16, 409–412.
- Kunkel, D. Microscopy. (2021). Science Photo Library Caption, Scanning electron micrograph (SEM) of *Candida albicans* - yeast stage, Erişim: 25 Kasım 2021, <https://www.sciencephoto.com/media/874098/view/candida-albicans-yeast-stage-sem>
- Kuran, B. (2021). *Candida* Belirtileri ve Fonksiyonel Tıp Tedavisi, Erişim: 27 Kasım 2021, <https://www.begumkuran.com/candida-belirtileri-ve-fonksiyonel-tip-tedavisi/>
- Kurt, A. G., Aytan, E., Ozer, U., Ates, B., & Geckil, H. (2009). Production of L-DOPA and dopamine in recombinant bacteria bearing the *Vitreoscilla* hemoglobin gene, *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 4(7), 1077-1088.
- Kusche-Gullberg, M., & Kjellén, L. (2003). Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis, *Current opinion in structural biology*, 13(5), 605–611.
- Kwok, L., Stapleton, A. E., Stamm, W. E., Hillier, S. L., Wobbe, C. L., & Gupta, K. (2006). Adherence of *Lactobacillus crispatus* to vaginal epithelial cells from women with or without a history of recurrent urinary tract infection, *The Journal of urology*, 176(5), 2050–2054.
- Laga, M., Manoka, A., Kivuvu, M., Malele, B., Tuliza, M., Nzila, N., Goeman, J., Behets, F., Batter, V., & Alary, M. (1993). Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study, *AIDS (London, England)*, 7(1), 95–102.
- Lagos, R. (2013). Bacteriocins, In S. Maloy, K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics Academic Press* (2nd ed., pp.277-279). Cambridge: Academic Press.
- Lagrotteria, D., Rotstein, C., & Lee, C. H. (2007). Treatment of candiduria with micafungin: A case series, *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, 18(2), 149–150.
- Larsen, B., & Monif, G. R. (2001). Understanding the bacterial flora of the female genital tract, *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(4), e69–e77.
- Larsen, B., & White, S. (1995). Antifungal effect of hydrogen peroxide on catalase-producing strains of *Candida* spp., *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 3(2), 73–78.

- Lauer, E., & Kandler, O. (1980). *Lactobacillus gasseri* sp. nov., a new species of the subgenus *Thermobacterium*. *Zentralblatt für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*, 1(1), 75-78.
- Lauer, E., Helming, C. & Kandler, O. (1980). Heterogeneity of the Species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Moquot as Revealed by Biochemical Characteristics and DNA-DNA hybridisation, *Zentralblatt für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*, 1(2), 150-168.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 72(4), 728–764.
- Lenander-Lumikari M. (1992). Inhibition of *Candida albicans* by the Peroxidase/SCN-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system, *Oral microbiology and immunology*, 7(5), 315–320.
- Ling, Z., Kong, J., Liu, F., Zhu, H., Chen, X., Wang, Y., Li, L., Nelson, K. E., Xia, Y., & Xiang, C. (2010). Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis, *BMC genomics*, 11, 488.
- Litwiniuk, M., Krejner, A., Speyrer, M. S., Gauto, A. R., & Grzela, T. (2016). Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration, *Wounds : a compendium of clinical research and practice*, 28(3), 78–88.
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H. & Cai, Y. (2014). Biodiversity of lactic acid bacteria. In H. Zhang, Y. Cai, (Eds.), *Lactic Acid Bacteria*. (pp. 103-203). Dordrecht: Springer.
- Loeffler, J., & Stevens, D. A. (2003). Antifungal drug resistance, *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 36(Suppl 1), S31–S41.
- Maccarana, M., Olander, B., Malmström, J., Tiedemann, K., Aebersold, R., Lindahl, U., Li, J. P., & Malmström, A. (2006). Biosynthesis of dermatan sulfate: chondroitin-glucuronate C5-epimerase is identical to SART2, *The Journal of biological chemistry*, 281(17), 11560–11568.
- Majoros, L., Szegedi, I., Kardos, G., Erdesz, C., Konya, J. & Kiss, C. (2006). Slow response of invasive *Candida krusei* infection to amphotericin B in a clinical time-kill study, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 25803-806.
- Malavaki, C., Mizumoto, S., Karamanos, N., & Sugahara, K. (2008). Recent advances in the structural study of functional chondroitin sulfate and dermatan sulfate in health and disease, *Connective tissue research*, 49(3), 133–139.
- Malmström, A., Bartolini, B., Thelin, M. A., Pacheco, B. & Maccarana, M. (2012). Iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate: biosynthesis and biological function, *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 60(12), 916–925.
- Martin, H. L., Richardson, B. A., Nyange, P. M., Lavreys, L., Hillier, S. L., Chohan, B., Mandaliya, K., Ndinya-Achola, J. O., Bwayo, J., & Kreiss, J. (1999). Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition, *The Journal of infectious diseases*, 180(6), 1863–1868.

- Martín, R., Sánchez, B., Suárez, J. E., & Urdaci, M. C. (2012). Characterization of the adherence properties of human Lactobacilli strains to be used as vaginal probiotics, *FEMS microbiology letters*, *328*(2), 166–173.
- Mastromarino, P., Brigidi, P., Macchia, S., Maggi, L., Pirovano, F., Trinchieri, V., Conte, U., & Matteuzzi, D. (2002). Characterization and selection of vaginal Lactobacillus strains for the preparation of vaginal tablets, *Journal of applied microbiology*, *93*(5), 884–893.
- Mastromarino, P., Di Pietro, M., Schiavoni, G., Nardis, C., Gentile, M., & Sessa, R. (2014). Effects of vaginal lactobacilli in Chlamydia trachomatis infection, *International journal of medical microbiology: IJMM*, *304*(5-6), 654–661.
- Matsuda, Y., Cho, O., Sugita, T., Ogishima, D., & Takeda, S. (2018). Culture Supernatants of Lactobacillus gasseri and L. crispatus Inhibit Candida albicans Biofilm Formation and Adhesion to HeLa Cells, *Mycopathologia*, *183*(4), 691–700.
- Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C. M., Curtiss, R., 3rd, Lehoux, B., & Fairbrother, J. M. (2003). Role of avian pathogenic Escherichia coli virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages, *Infection and immunity*, *71*(1), 494–503.
- Mendling, W. (2016). Vaginal Microbiota. In A. Schwiertz (Eds.), *Microbiota of the Human Body. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 902, pp.83-93). Springer, Cham.
- Midura, R. J., Calabro, A., Yanagishita, M., & Hascall, V. C. (1995). Nonreducing end structures of chondroitin sulfate chains on aggrecan isolated from Swarm rat chondrosarcoma cultures, *The Journal of biological chemistry*, *270*(14), 8009–8015.
- Mikami, T., & Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate, *Biochimica et biophysica acta*, *1830*(10), 4719–4733.
- Mills, S., Ross, R.P., Coffey, A. (2011). Lactic Acid Bacteria | Lactococcus lactis, In J. W. Fuquay (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd ed., pp.132-137), Cambridge: Academic Press.
- Minkoff, H., Grunebaum, A. N., Schwarz, R. H., Feldman, J., Cummings, M., Crombleholme, W., Clark, L., Pringle, G., & McCormack, W. M. (1984). Risk factors for prematurity and premature rupture of membranes: a prospective study of the vaginal flora in pregnancy, *American journal of obstetrics and gynecology*, *150*(8), 965–972.
- Mizumoto S., Kosho, T., Yamada, S. & Sugahara, K. (2017). Pathophysiological Significance of Dermatan Sulfate Proteoglycans Revealed by Human Genetic Disorders, *Pharmaceuticals*, *10*(34), 1-15.
- Monif, G. R. & Baker, D. A. (2003). Candida albicans. In G.R. Monif, D.A. Baker (Eds.), *Infectious diseases in obstetrics and gynecology* (5th ed., pp. 405-421). New York : Parthenon Press.
- Moulder J. W. (1991). Interaction of chlamydiae and host cells in vitro, *Microbiological reviews*, *55*(1), 143–190.

- Muriana, P. M., & Klaenhammer, T. R. (1991). Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088, *Applied and environmental microbiology*, 57(1), 114–121.
- Nader-Macías, M. E., & Juárez Tomás, M. S. (2015). Profiles and technological requirements of urogenital probiotics, *Advanced drug delivery reviews*, 92, 84–104.
- Naghmouchi, K., Belguesmia, Y., Bendali, F., Spano, G., Seal, B. S., & Drider, D. (2020). *Lactobacillus fermentum*: a bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications, *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(20), 3387–3399.
- Nami, Y., Abdullah, N., Haghshenas, B., Radiah, D., Rosli, R., & Khosroushahi, A. Y. (2014). Probiotic potential and biotherapeutic effects of newly isolated vaginal *Lactobacillus acidophilus* 36YL strain on cancer cells, *Anaerobe*, 28, 29–36.
- Nardini, P., Ñahui Palomino, R. A., Parolin, C., Laghi, L., Foschi, C., Cevenini, R., Vitali, B., & Marangoni, A. (2016). *Lactobacillus crispatus* inhibits the infectivity of *Chlamydia trachomatis* elementary bodies, in vitro study, *Scientific reports*, 6, 29024.
- Neill, T., Schaefer, L., & Iozzo, R. V. (2015). Decoding the Matrix: Instructive Roles of Proteoglycan Receptors, *Biochemistry*, 54(30), 4583–4598.
- Nenadić, D., & Pavlović, M. D. (2015). Value of bacterial culture of vaginal swabs in diagnosis of vaginal infections. *Vojnosanitetski pregled*, 72(6), 523–528.
- Newman, N. (2011). *Candida albicans*, Erişim: 29 Kasım 2021, <https://microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/candida-albicans-photos/candida-albicans-in-vaginal-discharge.html>
- Ninomiya, T., Sugiura, N., Tawada, A., Sugimoto, K., Watanabe, H., & Kimata, K. (2002). Molecular cloning and characterization of chondroitin polymerase from *Escherichia coli* strain K4, *The Journal of biological chemistry*, 277(24), 21567–21575.
- Nosanchuk, J. D., Stark, R. E., & Casadevall, A. (2015). Fungal Melanin: What do We Know About Structure?, *Frontiers in microbiology*, 6, 1463.
- Nour, M. (1998). 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis, *Research in microbiology*, 149(6), 433–448.
- Nozawa, Y. & Morita, T. (1986). Molecular mechanisms of antifungal agents associated with membrane ergosterol. Dysfunction of membrane ergosterol and inhibition of ergosterol biosynthesis. In K. Iwata, H. Vanden Bossche, (Eds), *In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents* (pp. 111). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Nugent, R. P., Krohn, M. A., & Hillier, S. L. (1991). Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation, *Journal of clinical microbiology*, 29(2), 297–301.
- Nyirjesy, P., Alexander, A. B., & Weitz, M. V. (2005). Vaginal *Candida parapsilosis*: pathogen or bystander?, *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 13(1), 37–41.

- O'Hanlon, D. E., Moench, T. R., & Cone, R. A. (2011). In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide, *BMC infectious diseases*, *11*, 200.
- O'Hanlon, D. E., Moench, T. R., & Cone, R. A. (2013). Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota, *PloS one*, *8*(11), e80074.
- Ohm, M. J., & Galask, R. P. (1975). Bacterial flora of the cervix from 100 prehisterectomy patients. *American journal of obstetrics and gynecology*, *122*(6), 683–687.
- Ohtsubo, K., & Marth, J. D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, *126*(5), 855–867.
- Orazov, M. R., Balan, V. E., Radzinsky, V. E., Khamoshina, M. B., & Toktar, L. R. (2020). Combination local therapy for genitourinary syndrome of menopause: treatment perspectives, *Gynecological and Reproductive Endocrinology and Metabolism*, *1*(2):113-119.
- Osset, J., Bartolomé, R. M., García, E., & Andreu, A. (2001). Assessment of the capacity of Lactobacillus to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells, *The Journal of infectious diseases*, *183*(3), 485–491.
- Ouwehand, A. C., ten Bruggencate, S. J., Schonewille, A. J., Alhoniemi, E., Forssten, S. D., & Bovee-Oudenhoven, I. M. (2014). Lactobacillus acidophilus supplementation in human subjects and their resistance to enterotoxigenic Escherichia coli infection, *The British journal of nutrition*, *111*(3), 465–473.
- Özçetin, M., Saz, E. U., Karapınar, B., Özen, S., Aydemir, Ş. & Vardar, F. (2009). Pediatric Nosocomial Infections; Incidence, Risk Factors, *Journal of Pediatric Infection*, *3*, 49-53.
- Pacheco, B., Malmström, A., & Maccarana, M. (2009). Two dermatan sulfate epimerases form iduronic acid domains in dermatan sulfate, *The Journal of biological chemistry*, *284*(15), 9788–9795.
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Schuster, M. G., Vazquez, J. A., Walsh, T. J., Zaoutis, T. E., & Sobel, J. D. (2016). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *62*(4), e1–e50.
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D., Benjamin, D. K., Jr, Calandra, T. F., Edwards, J. E., Jr, Filler, S. G., Fisher, J. F., Kullberg, B. J., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Rex, J. H., Walsh, T. J., Sobel, J. D., & Infectious Diseases Society of America (2009). Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *48*(5), 503–535.
- Parallel Universe. (2021). Gram Stain-Normal Vaginal Flora, Erişim: 29 Kasım 2021, <https://mad-scientist.tumblr.com/post/90417931584/monstarnz-gram-stain-normal-vaginal-flora>

- Pazos, C., Moragues, M. D., Quindos, G., Ponton, J., and del Palacio, A. (2006). Diagnostic potential of (1,3)-beta-D-glucan and anti-Candida albicans germ tube antibodies for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients, *Rev. Iberoam. Micol.* 23, 209–215.
- Pelletier, R., Alarie, I., Lagacé, R., & Walsh, T. J. (2005). Emergence of disseminated candidiasis caused by *Candida krusei* during treatment with caspofungin: case report and review of literature, *Medical mycology*, 43(6), 559–564.
- Petricevic, L., Domig, K. J., Nierscher, F. J., Sandhofer, M. J., Fidesser, M., Krondorfer, I., Husslein, P., Kneifel, W., & Kiss, H. (2014). Characterisation of the vaginal *Lactobacillus* microbiota associated with preterm delivery, *Scientific reports*, 4, 5136.
- Petricevic, L., Domig, K. J., Nierscher, F. J., Sandhofer, M. J., Krondorfer, I., Kneifel, W., & Kiss, H. (2013). Differences in the vaginal lactobacilli of postmenopausal women and influence of rectal lactobacilli, *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*, 16(3), 356–361.
- Petrova, M. I., Lievens, E., Malik, S., Imholz, N., & Lebeer, S. (2015). *Lactobacillus* species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health, *Frontiers in physiology*, 6, 81.
- Petrova, M. I., Reid, G., Vaneechoutte, M., & Lebeer, S. (2017). *Lactobacillus iners*: Friend or Foe?, *Trends in microbiology*, 25(3), 182–191.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Nagy, E., Dobiasova, S., Rinaldi, M., Barton, R., Veselov, A., & Global Antifungal Surveillance Group (2008). *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005, *Journal of clinical microbiology*, 46(2), 515–521.
- Phukan, N., Brooks, A., & Simoes-Barbosa, A. (2018). A Cell Surface Aggregation-Promoting Factor from *Lactobacillus gasseri* Contributes to Inhibition of *Trichomonas vaginalis* Adhesion to Human Vaginal Ectocervical Cells, *Infection and immunity*, 86(8), e00907-917.
- Plaas, A. H., Wong-Palms, S., Roughley, P. J., Midura, R. J. & Hascall, V.C. (1997). Chemical and immunological assay of the nonreducing terminal residues of chondroitin sulfate from human aggrecan, *The Journal of biological chemistry*, 272(33), 20603–20610.
- Polak, A., & Scholer, H. J. (1975). Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance, *Chemotherapy*, 21(3-4), 113–130.
- Pomin V. H. (2017). Antimicrobial Sulfated Glycans: Structure and Function. *Current topics in medicinal chemistry*, 17(3), 319–330.
- Pontón J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina [The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin], *Revista iberoamericana de micología*, 25(2), 78–82.

- Pot, B., Hertel, C., Ludwig, W., Descheemaeker, P., Kersters, K., & Schleifer, K. H. (1993). Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization, *Journal of General Microbiology*, 139(3), 513-517.
- Prabhakar, V., & Sasisekharan, R. (2006). The biosynthesis and catabolism of galactosaminoglycans, *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 53, 69–115.
- Praneenararat, S. (2014). The First Reported Case of Colonic Infection Caused by *Candida tropicalis* and a Review of the Literature. *Case reports in gastroenterology*, 8(2), 199–205.
- Prince, A. L., Antony, K. M., Chu, D. M., & Aagaard, K. M. (2014). The microbiome, parturition, and timing of birth: more questions than answers, *Journal of reproductive immunology*, 104-105, 12–19.
- Putonti, C., Ahmad, A., Baddoo, G., Diaz, J., Do, M., Gallian, N., Lorentzen, C., Mohammed, H., Murphy, J., Olu-Ajeigbe, A., Yang, T., Miller-Ensminger, T., Stark, N., Maskeri, L., Van Dusen, J., & Wolfe, A. J. (2019). Draft Genome Sequences of 11 *Lactobacillus jensenii* Strains Isolated from the Female Bladder, *Microbiology resource announcements*, 8(35), e00970-19.
- Pybus, V., & Onderdonk, A. B. (1999). Microbial interactions in the vaginal ecosystem, with emphasis on the pathogenesis of bacterial vaginosis, *Microbes and infection*, 1(4), 285–292.
- Ramandeep, Hwang, K. W., Raje, M., Kim, K. J., Stark, B. C., Dikshit, K. L., & Webster, D. A. (2001). Vitreoscilla hemoglobin. Intracellular localization and binding to membranes, *The Journal of biological chemistry*, 276(27), 24781–24789.
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S., McCulle, S. L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C. O., Brotman, R. M., Davis, C. C., Ault, K., Peralta, L., & Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1(Suppl 1), 4680–4687.
- Reid, G., & Burton, J. (2002). Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria, *Microbes and infection*, 4(3), 319–324.
- Reid, G., Younes, J. A., Van der Mei, H. C., Gloor, G. B., Knight, R., & Busscher, H. J. (2011). Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities, *Nature reviews. Microbiology*, 9(1), 27–38.
- Rendón-Maldonado, J. G., Espinosa-Cantellano, M., González-Robles, A., & Martínez-Palomo, A. (1998). *Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes, *Experimental parasitology*, 89(2), 241–250.
- Roberts I. S. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria, *Annual review of microbiology*, 50, 285–315.
- Roberts, I. S., Mountford, R., Hodge, R., Jann, K. B., & Boulnois, G. J. (1988). Common organization of gene clusters for production of different capsular polysaccharides (K antigens) in *Escherichia coli*, *Journal of bacteriology*, 170(3), 1305–1310.

- Robinson, R. & Itsaranuwat, P. (2005). In R.K. Robinson (Eds.), *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products* (3rd. ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Ryu, J. S., & Min, D. Y. (2006). Trichomonas vaginalis and trichomoniasis in the Republic of Korea, *The Korean journal of parasitology*, 44(2), 101–116.
- Sautter, R. L., & Brown, W. J. (1980). Sequential vaginal cultures from normal young women, *Journal of clinical microbiology*, 11(5), 479–484.
- Schiraldi, C., Cimini, D., & De Rosa, M. (2010). Production of chondroitin sulfate and chondroitin, *Applied microbiology and biotechnology*, 87(4), 1209–1220.
- Schleifer, K. H., & Ludwig, W. (1995). Phylogeny of the genus Lactobacillus and related genera, *Systematic and Applied Microbiology*, 18(4), 461–467.
- Senior K. (2012). Chlamydia: a much underestimated STI, *The Lancet. Infectious diseases*, 12(7), 517–518.
- Sgibnev, A. V., & Kremleva, E. A. (2015). Vaginal Protection by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Producing Lactobacilli. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(10), e22913.
- Sheth, C. C., Johnson, E., Baker, M. E., Haynes, K., & Mühlshlegel, F. A. (2005). Phenotypic identification of Candida albicans by growth on chocolate agar, *Medical mycology*, 43(8), 735–738.
- Shi, Y., Meng, Y., Li, J., Chen, J., Liu, Y. & Bai, X. (2014). Chondroitin sulfate: extraction, purification, microbial and chemical synthesis, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89: 1445-1465.
- Shieh, M.-J., Shang, H.-f., Liao, F.-H., Zhu, J.-S. & Chien Y.-W. (2011). Lactobacillus fermentum improved intestinal bacteria flora by reducing Clostridium perfringens, *E-Spen the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, 6, e59-e63
- Shipitsyna, E., Roos, A., Dancu, R., Hallén, A., Fredlund, H., Jensen, J. S., Engstrand, L., & Unemo, M. (2013). Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age--sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible?, *PloS one*, 8(4), e60670.
- Silbert, J. E., & Sugumaran, G. (2002). Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate, *IUBMB life*, 54(4), 177–186.
- Silva, M. B., Thomaz, L., Marques, A. F., Svidzinski, A. E., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Travassos, L. R., & Taborda, C. P. (2009). Resistance of melanized yeast cells of Paracoccidioides brasiliensis to antimicrobial oxidants and inhibition of phagocytosis using carbohydrates and monoclonal antibody to CD18. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(4), 644–648.
- Smith, A. N., Boulnois, G. J., & Roberts, I. S. (1990). Molecular analysis of the Escherichia coli K5 kps locus: identification and characterization of an inner-membrane capsular polysaccharide transport system, *Molecular microbiology*, 4(11), 1863–1869.
- Soong, D., & Einarson, A. (2009). Vaginal yeast infections during pregnancy, *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, 55(3), 255–256.

- Souza-Fernandes, A. B., Pelosi, P., & Rocco, P. R. (2006). Bench-to-bedside review: the role of glycosaminoglycans in respiratory disease, *Critical care (London, England)*, *10*(6), 237.
- Spear, G. T., French, A. L., Gilbert, D., Zariffard, M. R., Mirmonsef, P., Sullivan, T. H., Spear, W. W., Landay, A., Micci, S., Lee, B. H., & Hamaker, B. R. (2014). Human  $\alpha$ -amylase present in lower-genital-tract mucosal fluid processes glycogen to support vaginal colonization by *Lactobacillus*, *The Journal of infectious diseases*, *210*(7), 1019–1028.
- Spiegel, C. A., & Roberts, M. (1984). *Mobiluncus* gen. nov., *Mobiluncus curtisii* subsp. *curtisii* sp. nov., *Mobiluncus curtisii* subsp. *holmesii* subsp. nov., and *Mobiluncus mulieris* sp. nov., curved rods from the human vagina, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *34*(2), 177-184.
- Srinivasan, S., Liu, C., Mitchell, C. M., Fiedler, T. L., Thomas, K. K., Agnew, K. J., Marrazzo, J. M., & Fredricks, D. N. (2010). Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis, *PloS one*, *5*(4), e10197.
- Stamm W. E. (1999). Chlamydia trachomatis infections: progress and problems, *The Journal of infectious diseases*, *179 Suppl 2*, S380–S383.
- Stark, J. R., Judson, G., Alderete, J. F., Mundodi, V., Kucknoor, A. S., Giovannucci, E. L., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Fall, K., Kurth, T., Ma, J., Stampfer, M. J., & Mucci, L. A. (2009). Prospective study of *Trichomonas vaginalis* infection and prostate cancer incidence and mortality: Physicians' Health Study, *Journal of the National Cancer Institute*, *101*(20), 1406–1411.
- Stöber, H., Maier, E., & Schmidt, H. (2010). Protective effects of *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* and *Staphylococci* on the infection of cultured HT29 cells with different enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes are strain-specific, *International journal of food microbiology*, *144*(1), 133–140.
- Subramaniam, A., Kumar, R., Cliver, S. P., Zhi, D., Szychowski, J. M., Abramovici, A., Biggio, J. R., Lefkowitz, E. J., Morrow, C., & Edwards, R. K. (2016). Vaginal Microbiota in Pregnancy: Evaluation Based on Vaginal Flora, Birth Outcome, and Race, *American journal of perinatology*, *33*(4), 401–408.
- Sugahara, K., & Kitagawa, H. (2000). Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Current opinion in structural biology*, *10*(5), 518–527.
- Sundara Selvam, P.S., Chinnadurai, G.S., Ganesan, D. & Venkatachalam, K., (2020). Eggshell membrane-mediated V2O5/ZnO nanocomposite: synthesis, characterization, antibacterial activity, minimum inhibitory concentration, and its mechanism, *Applied Physics A*. *126*: 893
- Sutherland I. W. (1988). Bacterial surface polysaccharides: structure and function, *International review of cytology*, *113*, 187–231.
- Tachedjian, G., Aldunate, M., Bradshaw, C. S., & Cone, R. A. (2017). The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health, *Research in microbiology*, *168*(9-10), 782–792.

- Thomas, S. (1928). Döderlein's Bacillus: *Lactobacillus Acidophilus*, *The Journal of Infectious Diseases*, 43(3), 218–227.
- Thomas-White, K., Forster, S. C., Kumar, N., Van Kuiken, M., Putonti, C., Stares, M. D., Hilt, E. E., Price, T. K., Wolfe, A. J., & Lawley, T. D. (2018). Culturing of female bladder bacteria reveals an interconnected urogenital microbiota, *Nature communications*, 9(1), 1557.
- Tilsala-Timisjärvi, A., & Alatossava, T. (1997). Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR, *International journal of food microbiology*, 35(1), 49–56.
- Torella, M., Del Deo, F., Grimaldi, A., Iervolino, S. A., Pezzella, M., Tammaro, C., Gallo, P., Rappa, C., De Franciscis, P., & Colacurci, N. (2016). Efficacy of an orally administered combination of hyaluronic acid, chondroitin sulfate, curcumin and quercetin for the prevention of recurrent urinary tract infections in postmenopausal women. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 207, 125–128.
- Toth, A. (2021). MacLeod Laboratory, Chlamydial Infections of the Female Genital Tract, Erişim: 29 Kasım 2021, <http://www.fertilitysolution.com/Antibiotic-Therapy/Female-Chlamydial-Infections-of-the-Genital-Tract.html>
- Tressler, A. B., Fortin, C., Radeva, M., & Goje, O. (2018). 371. Risk Factors for Non-Albicans Candidal Vulvovaginitis, *Open Forum Infectious Diseases*, 5(Suppl 1), S145.
- Trofa, D., Gácsér, A., & Nosanchuk, J. D. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen, *Clinical microbiology reviews*, 21(4), 606–625.
- Tuan, R.S., (2004). Biology of Developmental and Regenerative Skeletogenesis, *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 427, 105-117.
- Tyuzikov, I. A., Zhilenko, M. I. & Polikarpova, S. R. (2018). Modern possibilities of optimization of local hormonotherapy of urogenital disorders in women on the basis of combined use of vaginal forms of estriol and progesterone, *Gynecology*, 20. 117-125.
- Ülke, E. N. (2019). *vgb+ Rekombinant E. coli Suşu ile Mikrobiyal Kondroitin Sulfat Üretimi* (Doktora tezi). İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Unver, T., Erenler, A. S., Melekoglu, R., Akpolat, N., Seckin, T., Azimov, R., & Ozaslan, F. B. (2020). Antifungal activity of microbial chondroitin sulfate against *Candida albicans*, *Medicine Science*, 9(2), 433-436.
- Uyama, T., Kitagawa, H. & Sugahara K. (2007). Biosynthesis of glycosaminoglycans and proteoglycans. In J.P. Kamerling (Ed.), *Comprehensive Glycoscience* (Vol. 3, pp. 79-104) Amsterdam: Elsevier.
- van der Veer, C., Hertzberger, R. Y., Bruisten, S. M., Tytgat, H., Swanenburg, J., de Kat Angelino-Bart, A., Schuren, F., Molenaar, D., Reid, G., de Vries, H., & Kort, R. (2019). Comparative genomics of human *Lactobacillus crispatus* isolates reveals genes for glycosylation and glycogen degradation: implications for in vivo dominance of the vaginal microbiota, *Microbiome*, 7(1), 49.

- Ventolini, G. (2015). Vaginal Lactobacillus: biofilm formation in vivo - clinical implications, *International journal of women's health*, 7, 243–247.
- Verstraelen, H., Verhelst, R., Claeys, G., De Backer, E., Temmerman, M., & Vaneechoutte, M. (2009). Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora, *BMC microbiology*, 9, 116.
- Vessella, G., Vázquez, J. A., Valcárcel, J., Lagartera, L., Monterrey, D. T., Bastida, A., García-Junceda, E., Bedini, E., Fernández-Mayoralas, A., & Revuelta, J. (2021). Deciphering Structural Determinants in Chondroitin Sulfate Binding to FGF-2: Paving the Way to Enhanced Predictability of their Biological Functions, *Polymers*, 13(2), 313.
- Vicariotto, F., Del Piano, M., Mogna, L., & Mogna, G. (2012). Effectiveness of the association of 2 probiotic strains formulated in a slow release vaginal product, in women affected by vulvovaginal candidiasis: a pilot study, *Journal of clinical gastroenterology*, 46 Suppl, S73–S80.
- Vielfort, K., Sjölander, H., Roos, S., Jonsson, H., & Aro, H. (2008). Adherence of clinically isolated lactobacilli to human cervical cells in competition with *Neisseria gonorrhoeae*, *Microbes and infection*, 10(12-13), 1325–1334.
- Vitali, B., Cruciani, F., Baldassarre, M. E., Capursi, T., Spisni, E., Valerii, M. C., Candela, M., Turrone, S., & Brigidi, P. (2012). Dietary supplementation with probiotics during late pregnancy: outcome on vaginal microbiota and cytokine secretion, *BMC microbiology*, 12, 236.
- Volpi, N., (2004). Disaccharide mapping of chondroitin sulfate of different origins by high-performance capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography, *Carbohydrate Polymers* 55(3), 273– 281.
- Voravuthikunchai, S. P., Bilasoi, S., & Supamala, O. (2006). Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli, *Anaerobe*, 12(5-6), 221–226.
- Wakabayashi, S., Matsubara, H., & Webster, D. A. (1986). Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*, *Nature*, 322(6078), 481–483.
- Wang, S., Sugahara, K., & Li, F. (2016). Chondroitin sulfate/dermatan sulfate sulfatases from mammals and bacteria, *Glycoconjugate journal*, 33(6), 841–851.
- Webster D. A. (1988). Structure and function of bacterial hemoglobin and related proteins. *Advances in inorganic biochemistry*, 7, 245–265.
- Weems Jr, J. J. (1992). *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 14(3), 756–766.
- Wessels, M. R., Goldberg, J. B., Moses, A. E., & DiCesare, T. J. (1994). Effects on virulence of mutations in a locus essential for hyaluronic acid capsule expression in group A streptococci, *Infection and immunity*, 62(2), 433–441.
- Whitfield, C., & Roberts, I. S. (1999). Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*, *Molecular microbiology*, 31(5), 1307–1319.

- Wiesenfeld, H. C., Hillier, S. L., Krohn, M. A., Landers, D. V., & Sweet, R. L. (2003). Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 36(5), 663–668.
- Wikimedia Commons. (2019). *Trichomonas vaginalis* (07).jpg, Erişim: 29 Kasım 2021, [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trichomonas\\_vaginalis\\_\(07\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trichomonas_vaginalis_(07).jpg)
- Willis, L. M., & Whitfield, C. (2013). Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydrate research*, 378, 35–44.
- World Health Organization. (2015). Sexually transmitted infections (STIs). World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wyrick P. B. (2000). Intracellular survival by *Chlamydia*, *Cellular microbiology*, 2(4), 275–282.
- Yang, Z. (2000). Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. University of Helsinki Department of Food Technology, Helsinki, 61 p. Retrieved from <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.631.3626&rep=rep1&type=pdf>
- Yu, X., Qian, G., Chen, S., Xu, D., Zhao, X., & Du, C. (2017). A tracheal scaffold of gelatin-chondroitin sulfate-hyaluronan-polyvinyl alcohol with orientated porous structure, *Carbohydrate polymers*, 159, 20–28.
- Zheng, N., Guo, R., Yao, Y., Jin, M., Cheng, Y., & Ling, Z. (2019). *Lactobacillus iners* Is Associated with Vaginal Dysbiosis in Healthy Pregnant Women: A Preliminary Study, *BioMed research international*, 2019, 6079734.
- Zhou, X., Bent, S. J., Schneider, M. G., Davis, C. C., Islam, M. R., & Forney, L. J. (2004). Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods, *Microbiology (Reading, England)*, 150 (Pt 8), 2565–2573.

## ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Tuba ÜNVER

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2005, İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- **Yüksek Lisans (Tezsiz)**: 2006, Fırat Üniversitesi, Eğitim Bilimleri Enstitüsü
- **İngilizce Dil Eğitimi**: 2009, Macquarie Üniversitesi (Sidney-Avustralya), English Language Centre
- **Yüksek Lisans** : 2011, Sydney Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji
- **Doktora** : 2022, İnönü Üniversite, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji

### MESLEKİ DENEYİM:

- 2014-devam ediyor: Araştırma görevlisi, İnönü Üniversitesi, Eczacılık fakültesi

### TEZ:

- **Ünver, T. (2011)**. *Infection and Co-infection in critical illness: Rapid diagnosis by MT-PCR* (Master's thesis). University of Sydney, Avustralya

### YAYINLAR:

- **Erenler, A. S., Bay Karabulut, A., Sevimli, R., Geckil, H., Akpolat, N., Ünver, T. & Otlu O. (2022)**. Biochemical Effect Evaluation of Microbial Chondroitin Sulphate in Experimental Knee Osteoarthritis Model, *Fresenius Environmental Bulletin*, 31(1), 510-517.
- **Karaer, A., Doğan, B., Günal, S., Tuncay, G., Arda Düz, S., Ünver, T., & Tecelioğlu, N. (2021)**. The vaginal microbiota composition of women undergoing assisted reproduction: a prospective cohort study. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, 128(13), 2101–2109.
- **Hazelton, B. J., Thomas, L. C., Ünver, T., & Iredell, J. R. (2013)**. Rapid identification of Gram-positive pathogens and their resistance genes from positive blood culture broth using a multiplex tandem RT-PCR assay. *Journal of medical microbiology*, 62 (Pt 2), 223–231.
- **Ünver T. & Erenler, A. Ş. (2020)**. Comparative evaluation of in-vitro methods for antimicrobial activity determination. In S. Öz, Y. Taşçı (Eds.), *Health And Science* (Chapter 6, pp.121-149). Ankara: Iksad Publications.
- **Erenler A.Ş. & Ünver T. (2021, Haziran)**. Animal-Originated Chondroitin Sulfate Extraction as an Anti- infective Agent for Biomedical Applications. In III. Uluslararası Akdeniz Bilimsel Araştırmalar Kongresi (pp. 1-5).

- **Erenler A.Ş., Ünver T., Akpolat N., Sevimli R. & Özaslan B. (2019, Mayıs).** Mikrobiyal Kondroitin Sülfatın *Staphylococcus aureus* Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması. Gevher Nasibe 3. Uluslararası Sağlık Bilimler Kongresi. (pp.56-59).
- **Özaslan F. B., Erenler A.Ş., Ünver T. (2019, Eylül).** Gag Added Proton Exchange Membrane Water Introduction And Proton Conductivity Analysis. III. Uluslararası Battalgazi Bilimsel Çalışmalar Kongresi. (pp.133-134).

#### **SEMİNERLER**

- Antimikrobiyal Aktivite Tayin Yöntemleri, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Seminer Salonu, Malatya, Türkiye, 16 Ocak 2020

#### **PROJELER**

- BAP Projesi: Mikrobiyal Kondroitin Sülfatın Antifungal Etkisinin Çeşitli Candida Suşlarında Farklı Antimikrobiyal Test Yöntemleri Kullanılarak Karşılaştırılması, 2020 (Proje No: FDK-2020- 2354)

#### **ÖDÜLLER/BAŞARILAR**

- Yurt dışı yüksek lisans ve dil eğitimi için burs, Milli Eğitim Bakanlığı, Türkiye Cumhuriyeti, Türkiye, 2007.
- Başarı Belgesi: Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Bölüm 3. sù olarak mezuniyet, İnönü Üniversitesi, Malatya, Türkiye, 2005.
- Lisans Eğitimi başarılı öğrenciler için burs, Milli Eğitim Bakanlığı, Türkiye Cumhuriyeti, Türkiye, 2003.

#### **DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN ÇALIŞMALAR**

- **Ünver T., Erenler A.Ş., Melekoğlu R., Akpolat N., Seçkin T., Azimov R. & Özaslan F.B. (2020).** Antifungal Activity of Microbial Chondroitin Sulfate Against *Candida albicans*, *Medicine Science*, 9(2), 433-436.
- **Ünver T., Erenler A.Ş., Melekoğlu R., Akpolat N., Seçkin T. , Azimov R. & Özaslan F.B. (2019, Mayıs).** Antifungal Activity of Microbial Chondroitin Sulfate Against *Candida albicans*. In International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Development (DRD 2019) (pp.224-227).