

**T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROPOLİSİN ETANOLİK EKSTRESİNİN *HELICOBACTER  
PYLORI* YE KARŞI ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan  
Ersin KARABULUT**

**Tezi Yöneten  
Yrd. Doç. Dr. Esmâ KAYA**

**Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**OCAK 2011  
KAYSERİ**

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROPOLİSİN ETANOLİK EKSTRESİNİN *HELICOBACTER  
PYLORI* YE KARŞI ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan  
Ersin KARABULUT**

**Tezi Yöneten  
Yrd. Doç. Dr. Esmâ KAYA**

**Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TSY- 09- 934 nolu  
proje ile desteklenmiştir.**


**OCAK 2011  
KAYSERİ**

Yrd. Doç. Dr. Esmâ KAYA' nın danışmanlığında Ersin KARABULUT tarafından hazırlanan "Propolisin etanolik ekstresinin *Helicobacter pylori*'ye karşı antimikrobiyal etkisinin araştırılması" adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı' nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

13/01/2011

**JÜRİ**

Başkan : Doç. Dr. Hatice ÖZBİLGE  
Üye : Doç. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK  
Üye : Yrd. Doç. Dr. Esmâ KAYA (Danışman)

**İmza****ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

**Enstitü Müdürü**  
**Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR**

## TEŞEKKÜR

Eđitimim ve tez çalışmam suresince değerli emeklerini ve katkılarını esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Esmá KAYA ve Anabilim Dalı Başkanım Doç. Dr. Hatice ÖZBİLGE' ye teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmam suresince desteğini her an yanımda hissettiğim sevgili aileme ve projemin yürütülmesindeki katkılarından dolayı Derya AKKUŐ'a teşekkür ederim.

Bu alışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Yüksek Lisans Tez Projesi ile desteklenmiştir. Maddi desteklerinden dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne teşekkür ederim.

**PROPOLİSİN ETANOLİK EKSTRESİNİN *HELICOBACTER PYLORI* YE KARŞI  
ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**ÖZET**

*Helicobacter pylori*, gastrit, duodenal ve peptik ülser, gastrik karsinoma ve mukoza ile ilişkili lenfoid doku lenfoması gibi pek çok gastrointestinal sistemle ilgili hastalıklara neden olmaktadır. Günümüzde *H. pylori*'nin eradike edilmesi için çeşitli çoklu antibiyotik rejimleri kullanılmakta, ancak gerek antibiyotik kullanımında yan etkilerin gözlenmesi, gerek bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirmeleri ve gerekse istenilen yanıtın her vakada alınamaması yeni tedavi arayışlarının ortaya çıkmasına ve böylece doğal kaynaklara yönelimin hızlanmasına neden olmuştur.

Propolis, bal arıları tarafından bitkilerden toplanan doğal bir ürün olup, antimikrobiyal, antioksidan, antitümöral, antiinflamatuvar gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilimsel çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmada, Kayseri ve çevresinden toplanan propolisin *H. pylori* üzerine antimikrobiyal aktivitesinin in vitro olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada, propolisin etanol ile hazırlanan ekstresi kullanıldı. Propolisin etanolik ekstraktının 16-1024 µg/ml aralığında iki kat artan konsantrasyonları hazırlandı ve *H. pylori* üzerine antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemleri kullanılarak araştırıldı. Disk difüzyon testine göre 64 µg/ml ve üzeri konsantrasyonlarda belirgin inhibisyon zon çapları gözlenirken, agar dilüsyon yönteminde minimal inhibitör konsantrasyon 128 µg/ml olarak belirlendi.

Sonuç olarak Kayseri ve çevresinden toplanan propolisin *H. pylori*'ye etkili olduğu gösterilmiş olup, bu çalışmanın propolisin *H. pylori* eradikasyonunda kullanımı ile ilgili deneysel ve klinik çalışmaların önünü açacağı düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** *Helicobacter pylori*, propolis, antimikrobiyal aktivite

## INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL EFFECTS OF ETHANOLIC EXTRACT OF PROPOLIS AGAINST *HELICOBACTER PYLORI*

### ABSTRACT

*Helicobacter pylori* is associated with gastritis, duodenal and peptic ulcers, gastric carcinoma and mucosa associated lymphoid tissue lymphoma. Today, in order to eradicate *H. pylori*, various multi antibiotic types are used but due to the observation of side effects in antibiotic usage, and the resistance development of bacteria against these antibiotics and not getting the demanded results in every event have caused searching new treatment forms and thus this has caused orientation to natural sources.

Propolis is a natural product which is collected from various plants by honey bees. It has been reported to possess various biological activities such as antibacterial, antioxidant, antitumoral and antiinflammatory. In this study, the antimicrobial activity of propolis collected from Kayseri and its around was investigated against *H. pylori*.

In this study, it was used ethanolic extract of propolis. It was prepared two fold concentrations between 16-1024  $\mu\text{g/ml}$  and was investigated the antimicrobial activity against *H. pylori* by disc diffusion and agar dilution methods. According to the disc diffusion test, while there were distinctive inhibition zone diameters in concentrations of 64  $\mu\text{g/ml}$  and higher, minimal inhibitor concentration was 128  $\mu\text{g/ml}$  according to agar dilution method.

Consequently, it was demonstrated that propolis collected from Kayseri and it's a round area was effective against *H. pylori* and this study was considered to provide conducting experimental and clinical trials on usage of propolis in *H. pylori* eradication.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, propolis, antimicrobial activity

## İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	I
KABUL ONAY SAYFASI.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ .....	VIII
KISALTMALAR .....	IX
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. <i>HELICOBACTER PYLORI</i> .....	3
2.1.1. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Tarihçesi.....	3
2.1.2. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Mikrobiyolojik Özellikleri.....	4
2.1.3. <i>Helicobacter pylori</i> İnfeksiyonunun Patogenezi.....	5
2.1.4. <i>Helicobacter pylori</i> ile İlişkili Hastalıklar .....	6
2.1.4.1. <i>Helicobacter pylori</i> -Peptik Ülser İlişkisi.....	6
2.1.4.2. <i>Helicobacter pylori</i> -Mide Kanseri İlişkisi.....	7
2.1.4.3. <i>Helicobacter pylori</i> -MALT İlişkisi.....	8
2.1.5. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Epidemiyolojisi.....	8
2.1.6. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Tedavisi.....	9
2.2. PROPOLİS.....	16
2.2.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri.....	17
2.2.2. Propolisin Kimyasal İçeriği.....	18
2.2.3. Propolisin Bitkisel Kaynakları.....	21
2.2.4. Propolisin Biyolojik Etkileri.....	23
2.2.4.1. Propolisin Antimikrobiyal Etkileri .....	24
2.2.4.2. Propolisin Antitümöral Etkileri.....	26
2.2.4.3. Propolisin Antioksidan Etkileri.....	27
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>29</b>
3.1. BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI.....	29
3.1.1. Kanlı Brucella Agar Besiyerinin Hazırlanması.....	29
3.1.2. Kanlı Mueller-Hinton Agar Besiyerinin Hazırlanması.....	30
3.1.3. Trypticase Soy Broth Besiyerinin Hazırlanması.....	30

3.2. MİKROORGANİZMANIN HAZIRLANMASI.....	30
3.2.1. Mikroorganizmanın Eldesi.....	30
3.2.2. Mikroorganizmanın Üretilmesi.....	31
3.3. PROPOLİS ELDESİ.....	31
3.3.1. Propolis Eldesi ve Ekstraksiyonu.....	31
3.3.2. Propolis Konsantrasyonlarının Hazırlanması.....	31
3.4. DUYARLILIK TESTLERİ.....	31
3.4.1. Disk Difüzyon Testi.....	32
3.4.1.1. Propolis Disklerinin Hazırlanması.....	32
3.4.1.2. Bakteri İnokulumunun Hazırlanması.....	32
3.4.1.3. Testin yapılışı.....	32
3.4.2. Agar Dilüsyon Testi.....	32
3.4.2.1. Besiyerinin Hazırlanması.....	32
3.4.2.2. Bakteri İnokulumunun Hazırlanması.....	33
3.4.2.3. Testin Yapılışı.....	33
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>34</b>
4.1. DİSK DİFÜZYON YÖNTEMİ.....	35
4.2. AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ.....	36
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>38</b>
<b>6.KAYNAKLAR.....</b>	<b>43</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

<b>Tablo 2. 1.</b> <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu tedavisinde önerilen tedavi protokolleri ...	11
<b>Tablo 2. 2.</b> Avrupa'nın değişik merkezlerinde <i>Helicobacter pylori</i> için primer direnç oranları .....	12
<b>Tablo 2. 3.</b> Doğu Avrupa merkezlerinde 1998-2000 yılları arasında <i>Helicobacter pylori</i> için primer direnç oranları.....	13
<b>Tablo 2. 4.</b> Türkiye'de yıllara göre, <i>Helicobacter pylori</i> için klaritromisin direnci.....	14
<b>Tablo 2. 5.</b> Metronidazol direncinin değişik ülkelerdeki sıklığı.....	15
<b>Tablo 2. 6.</b> <i>Helicobacter pylori</i> suşları üzerine bazı antibiyotiklerin duyarlılıkları.....	15
<b>Tablo 2. 7.</b> Propolis bileşenlerinin yüzdesi ve bileşen grupları.....	18
<b>Tablo 2. 8.</b> Propolisin kimyasal bileşenleri ve etkileri.....	20
<b>Tablo 2. 9.</b> Bitkisel kökenine ve kimyasal içeriğine göre propolis çeşitleri.....	22
<b>Tablo 4. 1.</b> Disk difüzyon testinde propolis diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları.....	35
<b>Tablo 4.2.</b> Agar dilüsyon testinde artan propolis konsantrasyonlarına göre <i>Helicobacter pylori</i> ' nin üreme durumu .....	36
<b>Şekil 2. 1.</b> <i>Helicobacter pylori</i> ' nin genel görünümü .....	5
<b>Şekil 2. 2.</b> <i>Helicobacter pylori</i> ile mide kanseri arasındaki ilişki .....	8
<b>Şekil 2. 3.</b> Propolisi elde etmek için çalışan bir bal arısı.....	17
<b>Şekil 2. 4.</b> Kovan içinden propolis örneği .....	18
<b>Şekil 2. 5.</b> Bazı propolis kaynağı bitkiler .....	23
<b>Şekil 3. 1.</b> Türbidometre cihazı .....	32
<b>Şekil 4. 1.</b> <i>Helicobacter pylori</i> ' nin gram boyama görüntüsü .....	34
<b>Şekil 4. 2.</b> Disk difüzyon testinde artan propolis konsantrasyonlarına göre inhibisyon zon çaplarının grafiği .....	35
<b>Şekil 4. 3.</b> Çözücü emdirilen disk çevresinden gram boyama görüntüsü .....	36

**KISALTMALAR****Kısaltmalar****Açıklama**

MALT	Mukoza ile ilişkili lenfoid doku
NSAİİ	Nonsteroid antiinflamatuvar ilaç
GİS	Gastrointestinal sistem
PPI	Proton pompa inhibitörü
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
CFU	Koloni oluşturan birim
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
°C	Santigrad Derece
dk	Dakika
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
g	Gram
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dipotasyum hidrojen fosfat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
NH <sub>4</sub>	Amonyum
NaCl	Sodyum klorür
L	Litre
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
IgG	İmmünglobülin G
GC-MS	Gaz Kromatografisi Mass Spektrometresi
C	Konsantrasyon
V	Volüm

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

*Helicobacter pylori*, dünya nüfusunun yaklaşık yarısının sindirim sisteminde kolonize halde bulunan spiral şekilli, gram-negatif, mikroaerofilik bir bakteridir. Tedavi edilmediği takdirde sindirim sisteminde yaşam boyu varlığını devam ettirmektedir. Bu konu ile ilgili yapılan ilk çalışmalar sonucu *H. pylori*, midenin normal flora üyesi olarak kabul edilmişken, daha sonra bu bakterinin lokal inflamasyona ve sistemik humoral bağışık yanıtı neden olduğu gösterilmiştir (1, 2).

İlk kez 1982 yılında gastritli bir hastanın mide biyopsi örneğinden izole edilen *H. pylori*, non-ülser dispepsi, peptik ve gastrik ülser, kronik gastrit ile adenokarsinom ve mukoza ile ilişkili lenfoid doku lenfoması (MALT) gibi gastrik kanserlerin gelişiminde etken olarak kabul edilmektedir. Temmuz 1994'te Dünya Sağlık Örgütü tarafından Grup 1 (kesin) insan karsinojeni olarak tanımlanmıştır (3, 4). Dünya nüfusunun yaklaşık yarısının bu mikroorganizma ile infekte olması ve malignite gibi çok ciddi hastalıklara sebep olabilmesi nedeniyle *H. pylori* infeksiyonlarının tanı ve tedavisi oldukça önemlidir.

Günümüzde *H. pylori*'nin eradike edilmesi için çeşitli çoklu antibiyotik rejimleri kullanılmakta, ancak gerek antibiyotik kullanımında yan etkilerin gözlenmesi, gerek bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirmeleri ve gerekse istenilen yanıtın her vakada

alınamaması yeni tedavi arayışlarının ortaya çıkmasına ve böylece doğal kaynaklara yönelimin hızlanmasına neden olmuştur (4, 5).

Propolis, bal arıları (*Apis mellifera L.*) tarafından bitkilerden toplanan ve yüzyıllar boyunca halk arasında tedavi amaçlı kullanılmakta olan doğal bir üründür. Propolisin antibakteriyel, antiviral, antioksidan, antiinflamatuvar ve immünmodülatör gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu birçok bilimsel çalışma ile gösterilmiştir (6, 7). Propolisin biyolojik aktivitesi toplandığı coğrafik bölgeye göre değişmekte olup bu çalışmada, Kayseri ve çevresinden toplanan propolisin antihelikobakter aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *HELICOBACTER PYLORI*

#### 2.1.1. *Helicobacter pylori*' nin Tarihçesi

1975 yılında Steer mide mukozasında mukus tabakasının altında gastritle ilgili bakterilere dikkat çekmiştir (8). Avustralya'da patolog olarak çalışan Robin Warren, ilk defa 1979 yılında gastrik inceleme yaptığı biyopsi örneklerinde kıvrık bakterilerin var olduğunu gözlemlemiştir. Bu bakterilerin gastrik mukozada olmadığını ve dokuyu örten mukus tabakası içinde bulunduğunu gözlemlemiştir (9).

*Helicobacter pylori* ilk olarak 1982 yılında Robin Warren ve Berry Marshall tarafından insan mide mukozasına ait endoskopik biyopsi örneklerinden izole edilmiş ve *Campylobacter pyloridis* olarak adlandırılmıştır (10). Bu araştırmacılar, gastrit ve peptik ülserli 34 hastanın mide biyopsi örneğini *Campylobacter* bakterisi izole etmek amacıyla *Campylobacter* kültür besiyerine ve aynı zamanda seçici olmayan besiyerlerine ekerek mikroaerofilik ortamda inkübe etmişler ve 48 saat sonra yapılan kontrolde üreme olmadığını görmüşlerdir. Ancak beş gün sonra değerlendirdiklerinde, biyopsi örneklerinin birinde *Campylobacter*'e benzer bol miktarda bakterinin ürediğini saptamışlardır. Çalışmanın devamında 11 hastanın mide biyopsisinden benzer mikroorganizmalar izole edilmiştir. Bu bakteri, yapısal ve biyokimyasal bakımdan bilinen hiçbir mikroorganizmaya benzerlik göstermemiştir (11).

Goodwin ve arkadaşları ise 1989 yılında yaptıkları 16S rRNA analizleriyle bu bakterinin *Campylobacter* cinsinden olmadığını göstermiş ve *H. pylori* olarak yeniden isimlendirmişlerdir (12). Helikal yapısı ve sıklıkla midenin pilor bölgesinden izole edilmesi nedeniyle bu adı almıştır (13).

Kronik aktif gastrit, duodenitis ve peptik ülser yıllardır bilinmesine rağmen *H. pylori* sözcüğü ancak 1989 yılında tanımlanmıştır (14).

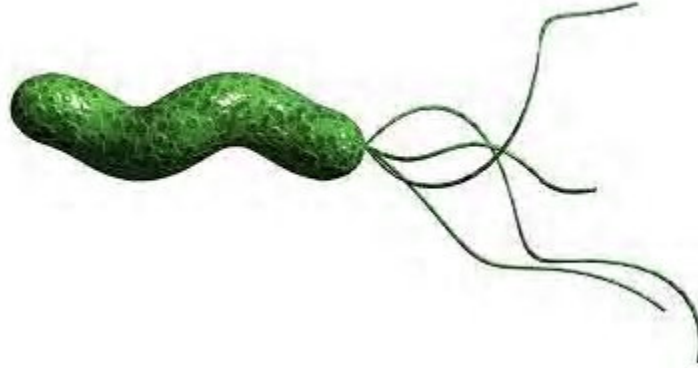
1994'te Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından *H. pylori*'nin peptik ülser hastalığının en önemli nedeni olduğu ve *H. pylori* ile infekte olan hastalarda bu mikroorganizmanın prekanseröz olması nedeniyle eradikasyonunun yapılmasının gerekliliği bildirilmiştir (10).

### **2.1.2. *H. pylori*'nin Mikrobiyolojik Özellikleri**

*H. pylori*, Spirillaceae familyasından, virgül, S veya spiral şekilli, sporsuz ve kapsülsüz bir mikroorganizmadır. 0.5-1.0 µm x 2.5-4.0 µm boyutlarında olan bu mikroorganizma, 4-6 adet kılıflı flagellaya sahiptir (Şekil 2.1). Gastrik mukus gibi visköz ortamlarda mikroorganizmanın hareketini sağlayan flagellalar aynı zamanda uç kısımlarındaki şişkinlikler ile *H. pylori*'nin, *Campylobacter* cinsinden ayırımını sağlamaktadır (terminal bulb) (15). Flagellaların bu özelliği bakteriye yoğun (visköz) sıvılarda tribuşon şeklinde daha rahat bir hareket şansı sağlamaktadır (16). *H. pylori* yaşaması için gerekli ortam şartlarının sağlanamadığı in vitro koşullarda, gastrointestinal sistemde kokoid veya sirküler şekiller alarak kendilerini koruyabilmektedirler (17).

*H. pylori* gram negatif, mikroaerofil bir bakteri olup oksidaz, katalaz ve üreaz enzimleri içermektedir. Nemli ve %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37 °C' de, 4-7 günde 1 mm çapında, şeffaf, yuvarlak, S tipi koloniler oluşturur (15). Zenginleştirilmiş brain-heart agarda 33-40 °C' de ve pH 6.6-8.4 arasında iyi ürer. Brain-heart infüzyon agar, brucella agar, çukulata agar, colombia agar, skirrow gibi zenginleştirilmiş besiyerleri *H. pylori*'nin üremesi için yeterlidir. Saponin içeren %7 at kanlı ya da koyun kanlı agara %1 isovitalax ilavesi üremeyi hızlandırır (8).

İlk defa 1997'de *H. pylori*'nin tüm genomu açıklanmıştır. Buna göre *H. pylori*'nin genom uzunluğu 1.6- 1.73 Mb arasında değişir. *H. pylori* izolatlarının %40'ı uzunluğu 1.5-23.3 Kb arasında değişen plazmidler içerirler (18).



Şekil 2.1. *Helicobacter pylori*' nin genel görünümü

### 2.1.3. *H. pylori* İnfeksiyonunun Patogenezi

*H. pylori* kronik gastriti tetikleyen bir bakteridir ve peptik ülser ile distal gastrik kanserler için bilinen en güçlü risk faktörüdür (19). Bakterinin esas olarak yerleştiği yer midedir ve burada kronik bir enfeksiyona yol açar. Fakat ektopik gastrik mukoza, gastrik metaplazi gibi gastrik tip epitel hücrelerinin bulunduğu duodenum, özofagus gibi gastrointestinal sistemin herhangi bir bölgesine de yerleşebilir (20). Ancak, bakterinin kolonize olduğu kişilerin sadece bir kısmında klinik hastalık gelişmektedir (19). Bu kolonizasyonu sağlayan majör faktörler midenin mikroaerofilik yapısı, mukusta yaşama özelliği, spiral şekil, flajellalar ve üreaz aktivitesidir. Spiral şeklinin yol açtığı motilite ve üreaz bunlardan en önemlileridir. Mukus içinde serbest yaşayabildiği gibi, bazen mukozal epitelyal hücrelere yapışabilir. Epitel hücre yüzeyi ve intraepitelyal alanda; kan grubu antijenlerine, lewis A ve lewis B antijenlerine, siyalize proteinlere, bağ dokuda; laminin, vitronektin ve kollajene bağlanıp bu yapıların bütünlüğünü bozar (21). *H. pylori* gastrik ortamda yaşamını sürdürebilmektedir. Sadece gastrik tipteki epitel hücrelerine yerleşir, barsak epitel hücrelerine yerleşmez (22). *H. pylori* salgıladığı üreaz enzimiyle CO<sub>2</sub> ve NH<sub>4</sub> oluşturur. Bu ürünler bakteriyi mide asidinden korur, mide epiteli için toksiktir. NH<sub>4</sub> hücreler arası tutunmayı azaltır ve *H. pylori*'nin sitotoksinlerinin etkisini artırır, nötrofillerin başlattığı mukozal hasarı potansiyalize eder. Ayrıca gastritin kronikleşmesini ve ülser oluşumunu provake eder. *H. pylori* suşlarının %80'inde CagA geni ile kodlanan sitotoksin bulunmaktadır. Gen bölgelerinin kodladığı proteinler epitelde tirozin fosforilasyonunu indükleyerek inflamatuvar cevabı başlatan tirozin kinazı aktive ederler. Bu gen sadece VacA geni varlığında bulunur (21). Tüm *H. pylori* suşlarında bulunan VacA toksininin patogeneizde önemli bir rolü olduğu

gösterilmiştir. Epitelde vakuolizasyon yapması, apopitozu indüklemesinin dışında, asit sekresyonunu inhibe edici, pepsinojen salgısını artırıcı, hücre proliferasyonunu inhibe edici, parasellüler permeabiliteyi artırıcı, mitokondriyal hasar yapıcı etkisi vardır (23). VacA geni tüm *H. pylori* suşlarında olmasına rağmen bakterilerin sadece %65’inde aktif sitotoksin proteini üretir. İnfekte kişilerde bu toksine karşı nötralizan antikorlar genellikle bulunur (21). *H. pylori*’nin antijen çeşitliliği peptik ülser, kronik gastrit, gastrik kanser ve MALT lenfomada birbirinden farklıdır. Farklı antijenler midede T hücre aracılı immün yanıtı uyarır (24).

#### **2.1.4. *H. pylori* İle İlişkili Hastalıklar**

##### **2.1.4.1. *H. pylori* - Peptik Ülser İlişkisi**

*H. pylori* ile infekte kişilerin tümünde gastrit gelişirken, neden sadece %20-30’unda peptik ülser, mide kanseri, MALT lenfoma gibi patolojilerin geliştiği tam olarak bilinmemektedir. Bu duruma, kişiye ait genetik, immünolojik özellikler, sigara, alkol gibi alışkanlıklar, tuzlu diyet, tütsülenmiş besinlerin alınması gibi diyete ait faktörler, çinko, selenyum gibi element eksiklikleri, C, A ve E vitamin eksiklikleri ve çevresel faktörlerin yanı sıra, bakteriye ait patojenik özelliklerin neden olduğu düşünülmektedir (20).

Peptik ülser hastalığının başlıca etkeni *H. pylori*’dir. *H. pylori* ile peptik ülser arasındaki ilişkiyi ilk olarak Warren ve Marshall göstermiştir (24). Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü, 1994’te *H. pylori*’nin peptik ülser hastalığının en önemli nedeni olduğunu ve *H. pylori* ile infekte ülseri olan hastalarda bu mikroorganizmanın antimikrobiyal tedavi ile eradikasyonunun gerekliliğini bildirmiştir (25).

*H. pylori* gastriti, duodenal ülserli olguların %95-100’ünde, mide ülserli olguların da %75-85’inde bulunmaktadır. Mide ülserli olguların %20’sinde ülser, *H. pylori* enfeksiyonu olmadan sadece aspirin ve diğer non-steroid antiinflamatuvar ilaçların (NSAİİ) kullanımı sonucudur, mide ülserli olguların bir bölümünde sadece *H. pylori* gastriti bulunur, bir bölümünde de *H. pylori* gastriti ve NSAİİ kullanımı birlikte (26).

Benign mide ülserlerinde duodenal ülsere kıyasla daha az oranda *H. pylori* enfeksiyonu vardır. Bunun sebebi mide ülserlerine aspirin veya diğer NSAİİ kullanımının daha yüksek oranda etki etmesidir (27).

NSAİİ kullanımı *H. pylori* prevalansını değiştirmmez. NSAİİ kullananlarda gastrik ya da duodenal ülser gelişimi *H. pylori* varlığından etkilenmez. *H. pylori*, NSAİİ'lerin prostoglandin sentezini inhibe edici etkilerini değiştirmmez, bu durum NSAİİ'lere bağlı olarak gelişen duodenal hasar üzerine *H.pylori* etkisinin olmadığını düşündürmektedir (28).

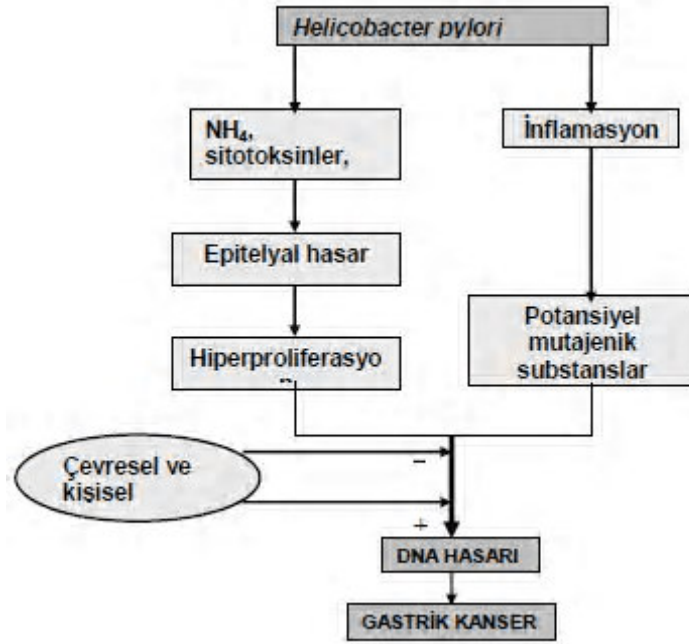
#### **2.1.4.2. *H. pylori* - Mide Kanseri İlişkisi**

Mide kanserlerinin yaklaşık %95'ini mide adenokarsinomu oluşturur ve midede en sık rastlanan tümördür (29). Mide adenokarsinomu görülme sıklığı ve kansere bağlı ölüm sıklığı açısından, tüm dünyada, ikinci sıradaki kanser türüdür. Ancak mide kanseri insidansı ve buna bağlı ölüm oranları, son yıllarda düşüş göstermektedir (30).

Mide kanseri, sosyoekonomik durum, *H. pylori* gibi faktörlerle çarpıcı ilişkilerinin olmasından dolayı, insan kanserlerinde çevresel faktörlerin de etkili olduğunun ortaya koyulması açısından özel bir öneme sahiptir (30). Gastrik karsinogenez karmaşık, çok basamaklı ve çok etkenli bir sonuçtur. Başta çevresel faktörler olmak üzere birçok faktörün etyolojide rol oynadığı bilinmektedir (25). Gastrik kanserin intestinal tip (iyi diferansiye) ve indiferansiye tip olarak iki farklı histolojik formu tanımlanmıştır. İntestinal tip, erkeklerde ve ileri yaş gruplarında daha sık, indifransiye tip mide kanseri ise genç yaş grubunda göreceli olarak daha sık görülür ve kadın-erkek oranı yaklaşık aynıdır (30).

Mide kanseri etyolojisinde en çok suçlanan faktörlerin başında prekanseröz mide lezyonları gelmektedir. İntestinal tip mide karsinogenezinde olaylar sırasıyla; kronik gastrit, atrofi, intestinal metaplazi, displazi ve karsinoma şeklinde gelişir. Kansere giden bu süreci genelde *H. pylori* infeksiyonu başlatır (31). Mide kanseri olgularında *H. pylori* infeksiyonunun mevcudiyetini veya geçirildiğini gösteren *H. pylori* IgG antikorlarının, kontrollere oranla anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Bu retrospektif çalışmalar *H. pylori*'nin mide kanserinin etyolojisinde rol oynayabileceğini düşündürmüş ve daha sonra planlanan prospektif çalışmalarda da mide kanseri ile *H. pylori* arasında ilişki bulunmuştur. Bu veriler ışığında Dünya Sağlık Örgütü'nün 1994 yılındaki değerlendirmesinde *H. pylori*, mide kanseri için birinci derece karsinojen kabul edilmiştir (32). Karasu ve arkadaşları çalışmalarında mide kanserli hastaların cerrahi rezeksiyon materyallerinde %67'lik oranda *H. pylori* varlığı saptamışlardır. Başka çalışmalarda da mide kanserli hastalarda %21-100 oranlarında *H. pylori* izole

edilmiştir (33, 34). *H. pylori* ile mide kanseri arasındaki ilişki Şekil 2.2’de gösterilmiştir (25).



Şekil 2.2. *Helicobacter pylori* ile mide kanseri arasındaki ilişki

### 2.1.4.3. *H. pylori*-MALT (Mukoza ile ilişkili lenfoid doku lenfoması) Arasındaki İlişki

*H. pylori* enfeksiyonu ile ilişkilendirilen ikinci tümöral oluşum, mide lenfoması yani mukoza ile ilişkili lenfoit doku tümörüdür. MALT’ın *H. pylori* ile ilişkisi mide kanserinden daha belirgindir. MALT olan hastaların %72-98’inde *H. pylori* pozitifliği saptanmıştır. Patogeneizde *H. pylori*’nin neden olduğu kronik antijenik stimülasyonun rol oynadığı, buna bağlı olarak poliklonal lenfoit yanıtın uyarıldığı, sonrasında neoplastik transformasyonun geliştiği ileri sürülmektedir (20). İlk kez Watherspoon ve arkadaşları, *H. pylori*’nin eradike edilmesiyle mide MALT lenfomasında gerileme olabileceğini göstermişlerdir (28). Son çalışmalarda ilerlememiş evrelerde *H. pylori* eradikasyonu ile tümör histolojisinde düzelme olduğu gösterilmiştir (27).

### 2.1.5. *H. pylori*’nin Epidemiyolojisi

*H. pylori*’nin genel rezervuarı insandır. Fekal-oral ya da oral-oral geçiş söz konusu olabilmektedir. Fekal materyal ile kirlenmiş su ve besinlerin kaynak olabileceği düşünülmüş ise de, henüz doğada, *H. pylori* saptanmamıştır. Diş plaklarının *H. pylori*

için rezervuar olduğuna dikkat çekilmektedir. Bu şekilde başkalarını infekte etme ve reinfeksiyon riski vardır (8).

*H. pylori* dünyanın en yaygın infeksiyonuna neden olmaktadır ve dünya popülasyonunun ortalama %60'ının bu bakteri ile infekte olduğu bilinmektedir. İnfeksiyon sıklığı, yaş, sosyoekonomik durum ve etnik farklılıklar gözetmeksizin gelişmiş ülkelerde %35, gelişmekte olan ülkelerde %75'dir. Gelişmiş ülkelerde prevalans çocuklukta düşüktür ve yaşla artar, 50 yaş civarında %50'dir. Gelişmekte olan ülkelerde çocukluk dönemi, infeksiyonun en çok görüldüğü dönemdir. Düşük sosyoekonomik durum, kötü su kaynaklarının kullanımı, kalabalık ailelerde yaşam prevalansını yükseltir ve infeksiyonu alma yaşını düşürür (26). Avrupa ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri gibi gelişmiş ülkelerde çocukluk çağındakilerin %0-5'i, 20 yaş civarındakilerin %10-20'si, yetişkinlerin ise %30-50'sinin bu bakteri ile infekte olduğu saptanmıştır. Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde sağlıklı yaşam koşullarının yeterince sağlanamaması ve yetersiz sosyoekonomik şartlar nedeniyle 5-10 yaş arasında prevalans %60-70 civarında olup, yetişkinlerde ise bu oran %85-90'ları bulmaktadır. Ülkemizde 1998'deki verilere göre 14 yaş altı çocuklarda prevalans oranı %78 iken 2000 yılında bu oran %62 olarak tespit edilmiştir. Bakterinin kolonizasyon oranları kadınlar ve erkeklerde benzerdir. Bazı ırk ve gruplarda prevalansın daha fazla saptanması, genetik yatkınlığın olabileceğini düşündürse de nedeni kesin olarak anlaşılamamıştır. Son yıllarda gelişmiş toplumlarda görülen *H. pylori* prevalansındaki azalma, ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerde görülememektedir (20).

#### **2.1.6. *H. pylori*' nin Tedavisi**

Günümüzde *H. pylori*'nin birçok hastalıkla ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu hastalıklardan bazıları mide ülseri, duodenum ülseri, mide kanseri, mide lenfoması ve gastrittir. Ayrıca son zamanlarda koroner kalp hastalığıyla ilişkisi üzerine çalışmalar yapılmaktadır (27). *H. pylori* ile dünya nüfusunun yarısından fazlasının, ülkemizin %85-90'ının infekte olması *H. pylori*'nin önemini artırmaktadır (18). Tüm bu nedenlerden ötürü *H. pylori*'nin eradikasyonu elzem bir hal almıştır.

*H. pylori* ile ilişkisi kesin olarak kanıtlanmış hastalıklarda eradikasyon tedavisi yapılmalıdır (20). Avrupa *H. pylori* Çalışma Grubu, eradikasyon tedavisi için endikasyonları şöyle sıralamıştır:

- a. Peptik ülser aktif olsa da olmasa da *H. pylori* pozitif ise mutlaka tedavi edilmelidir.
- b. Peptik ülser kanaması geçirenler tedavi edilmelidirler.
- c. Düşük grade MALT lenfomada eradikasyon gereklidir. Lenfomanın tamamen iyileşmesini sağlayabilir.
- d. Ciddi aktif kronik gastrit olgularında inflamasyonu geriletmediği için eradikasyon tedavisi önerilir.
- e. Erken mide karsinomu vakaları mutlaka tedavi edilmelidir. Ailesinde mide karsinomu öyküsü olanlara da tedavi önerilir.
- f. Peptik ülser dolayısıyla opere olan hastalarda nüksleri azalttığı için eradikasyon tedavisi önerilir.
- g. NSAİİ ve *H. pylori* birbirlerinin zararlı etkilerini artırır. Bu nedenle NSAİİ kullanımı bırakıldıktan sonra eradikasyon tedavisi önerilir (35).

Peptik ülserli hastalarda *H. pylori* eradikasyonunun, ülser yinelenmesinde azalma, ülser iyileşmesinde hızlanma ve ülserin yeniden kanamasını engelleme gibi yararları gözlenmiştir. Ayrıca, düşük dereceli mide lenfoması olan hastalarda infeksiyonun eradikasyonunun, çoğu vakada tümörün gerilemesine neden olduğu gösterilmiştir (36). Bakterinin midede mukus tabakası altında canlı kalabilme yeteneği ve ilaçlara karşı direnç geliştirebilmesi gibi nedenlerle tek bir ilaçla tedavi günümüzde artık önerilmemektedir. Amoksisilin, tetrasiklin, klaritromisin ve metronidazol *H. pylori* eradikasyonunda en sık kullanılan antibiyotiklerdir. Bazı ülkelerde fluorokinolonlar ve furazolidon da yaygın olmamakla birlikte kullanılmaktadır (18). *H. pylori* eradikasyonunda pek çok tedavi rejimi önerilmekle birlikte optimal tedavi rejimi halen tanımlanamamıştır (37). Günümüzde uygulanan standart tedavi protokolü iki antibiyotiğe (amoksisilin, klaritromisin) bir proton pompa inhibitörü (PPI) veya bizmut tuzu eklenerek yapılan üçlü tedavidir, ancak tedavi süresi konusunda tartışmalar devam etmektedir (20, 36). Bu tedavi protokolünün etkinliği klinik çalışmalarla gösterilmiş olmasına rağmen, başarı oranı % 70-95 gibi geniş bir aralıkta dalgalanmaktadır (36).

*H. pylori* infeksiyonu tedavisinde önerilen tedavi protokolleri Tablo 2.1'de verilmiştir (38, 18). Eradikasyon tedavisinde önerilen PPI, klaritromisin, amoksisilinden oluşan üçlü kombinasyon Amerika ve Avrupa'da yüksek başarı oranları gösterirken aynı

oranlar ülkemizde gözlenmemektedir. Bu farklılığın nedenleri olarak, *H. pylori* yoğunluğu ve antibiyotiklere karşı direnci, tedavi süresi, ilaç formülasyonları arasındaki farklılıklar, hasta uyumu gösterilebilir (32). *H. pylori* pozitif 45 vakada yapılan bir çalışmada; lansoprazol, klaritromisin ve amoksisilin bir haftalık kombine tedavisinin sonucunda %95 eradikasyon oranı bildirilmiştir (39). Kearney ve arkadaşlarının 38 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, lansoprazol, tetrasiklin, metronidazol, bizmut sitrat dördü kombine tedavisinde 14 günlük uygulama sonucunda %87'lik bir başarı oranı görülmüştür (40).

Günümüzde kullanılan tedavi yöntemlerinin *H. pylori* infeksiyonunu %90'lara varan oranlarda tedavi ettiği bildirilmekle birlikte, ülkemizde son dönemde yapılan çalışmalarda bu oranlar %46 ve %56 gibi çok daha düşük düzeydedir (6).

İlk verilen tedavi ile *H. pylori* eradikasyonu başarılı olamayan vakalarda ikinci tedavinin başarı şansı daha da düşüktür. İlk tedavide başarı sağlanamayan vakalarda dördü tedavi önerilmektedir. İkinci tedavide dikkat edilmesi gereken husus ilk tedavi protokolüyle aynı antibiyotiklerin mümkün olduğunca kullanılmamasıdır (23).

Aydemir ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada olduğu gibi dispeptik şikâyetlerle başvuran hastalardan, daha önce *H. pylori* eradikasyon tedavisi almış ve almamış hasta gruplarındaki *H. pylori* sıklığının birbirine çok yakın çıkması eradikasyondaki başarı oranını düşündürmektedir (41).

**Tablo 2.1.** *H.pylori* infeksiyonu tedavisinde önerilen tedavi protokolleri

• Klaritromisin + amoksisilin + proton pompa inhibitörü (PPI)
• Tetrasiklin + metronidazol + PPI
• Klaritromisin + amoksisilin + ranitidin bizmut sitrat
• Tetrasiklin + metronidazol + ranitidin bizmut sitrat
• Klaritromisin+ amoksisilin+ PPI + ranitidin bizmut sitrat
• Tetrasiklin + metronidazol + PPI + ranitidin bitmut sitrat

Hiçbir eradikasyon tedavisi %100 etkili değildir (42). Tedavi alan hastaların yaklaşık %20'sinde *H. pylori* eradikasyonu başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Tedavideki başarısızlığın sebepleri;

- Antibiyotiklerin mukozada yeterli yoğunlukta toplanmamaları ve sekrete edilmemeleri
- Değişik pH' larda özellikle asidik ortamda stabiliteilerinin sağlanamaması
- Midenin boşalması ile ilaçların midede kalış sürelerinin kısalması
- Mukusun lümen ve epitel tarafındaki pH farklılıkları
- Özellikle asit pH'larda stabilitenin sağlanamaması
- Bakterinin mukusun derin tabakalarına yerleşmesi
- Dirençli hatta birden fazla ilaca dirençli suşların bulunması
- Bakterinin katalaz aktivitesi ile fagositozdan kurtulması
- *H. pylori'* nin fizik ve kimyasal streslere morfoloji, metabolizma, üreme, özelliklerini değiştirmek suretiyle kokkoid forma dönüşerek yanıt vermesi (18).

*H. pylori* tedavisindeki başarısızlığın en önemli sebebinin antibiyotik direnci olduğu belirtilmektedir ve direnç oranları her geçen gün artmaktadır (43). Tablo 2.2 ve Tablo 2.3'de sırasıyla 1998'de farklı Avrupa merkezlerinde ve 1998-2000 yılları arasında Doğu Avrupa merkezlerinde *H. pylori'*de primer direnç oranları gösterilmiştir (18, 43).

**Tablo 2.2.** Avrupa'nın değişik merkezlerinde *Helicobacter pylori* primer direnç oranları

Ülke	Direnç sıklığı (%)		
	Metronidazol	Klaritromisin	Amoksisilin
Belçika	18,9	10,5	0,0
Fransa	19,7	4,7	0,0
Norveç	21,7	0,0	0,0
Hollanda	23,4	1,3	0,0
Almanya	24,6	2,7	0,9
İngiltere	28,9	1,3	1,2
Danimarka	32,0	4,0	4,0
İsveç	38,9	5,1	0,0
Yunanistan	44,1	10,2	1,7
İtalya	49,0	27,2	8,2

**Tablo 2.3.** Doğu Avrupa merkezlerinde 1998-2000 yılları arasında *Helicobacter pylori* için primer direnç oranları

Antibiyotik	% Direnç
Metronidazol	37,9
Klaritromisin	9,5
Amoksisilin	0,9
Tetrasiklin	1,9

Birçok makrolid antibiyotik olmasına rağmen *H. pylori* eradikasyonunda düşük minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri ve uygun farmakokinetik özellikleri nedeniyle en çok klaritromisin kullanılır ve monoterapide %40-45 eradikasyon sağlar, ikili tedavide %20-60, üçlü tedavide ise bu oran %90'a kadar çıkabilir bu yüzden klaritromisin *H. pylori* eradikasyonunda kullanılan en etkili antibiyotiktir (18). Ancak son yıllarda klaritromisine artan oranda direnç geliştiği bildirilmektedir. Hatta eradikasyondaki başarısızlığın en önemli nedeni olarak gösterilmektedir. Klaritromisin direncinin %15-20 olduğu bölgelerde klaritromisin kullanılmamalıdır (43).

Ülkemizde metronidazol direnci %40-85, klaritromisin direnci %8-56, tetrasiklin direnci %0-4, siproflaksasin direnci %3,8-8, amoksisilin direnci ise nadir olarak belirtilmektedir (43). Tablo 2.4, 2.5 ve 2.6'da *H. pylori* ile yapılan değişik çalışmalarda antibiyotik direnç oranları sunulmuştur (43, 18).

**Tablo 2.4.** Türkiye'de yıllara göre *Helicobacter pylori* için klaritromisin direnci

YIL	ŞEHİR	DİRENÇ %
1994	Ankara	21
1996	İzmir	0
1197	İzmir	5,4
1197	Ankara	0
1999	Diyarbakır	18,7
2000	Malatya	9,8
2001	Ankara	11,4
2003	Adana	24,5
2004	Ankara	16,9
2004	Ankara	16,2
2004	Adana	21
2004	Kocaeli	9
2004	İzmir	48,2
2004	Ankara	56
2005	İzmir	38,8
2005	Ankara	55
2006	Mersin	40,5
2006	Ankara	35
2006	Konya	35,7-64
2006	Diyarbakır	16,4

**Tablo 2.5.** Metronidazol direncinin değişik ülkelerdeki sıklığı

ÜLKE	%
İspanya	%6
İsveç	%10
Avustralya	%17
Portekiz	%23
Fransa	%25
Kanada	%35
Yunanistan	%45
Brezilya	%65
Zaire	%88

**Tablo 2.6.** *Helicobacter pylori* suşları üzerine bazı antibiyotiklerin duyarlılıkları

İlaçlar	Duyarlı %	Dirençli %
Tetrasiklin	90,6	9,4
Ofloksasin	93,8	6,25
Azitromisin	93,8	6,25
Klaritromisin	81,3	18,7
Amoksisilin	90,6	9,4
Metronidazol	37,5	62,5

Metronidazole direnç oranı, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler arasında ciddi farklılık gösterir. Gelişmiş ülkelerde metronidazole direnç oranı %10-50 arasında iken gelişmekte olan ülkelerde bu oran %90-100'lere çıkmaktadır. Bunun nedeni gelişmekte olan ülkelerde dental, genital, parazitik gibi infeksiyonların sık görülmesi ve bunların tedavisinde ucuz bir ilaç olan metronidazolün tercih edilmesidir (18).

## 2.2. PROPOLİS

Propolis, genellikle *Apis mellifera* olarak isimlendirilen bal arıları tarafından toplanan doğal bir üründür. Propolis terimi ilk kez Eski Yunanlar tarafından kullanılmıştır. “Pro” eki ön, giriş; “polis” ise şehir anlamına gelmektedir. Kalıp olarak ise “şehrin defansı”, “kovanın defansı” anlamına gelmektedir (44). Propolis yüzyıllar boyunca doğal bir antibiyotik olarak kullanılmıştır. Yunan yazıtlarında iltihaplanan yaralarda ve diş eti çürüklerinde tedavi amaçlı kullanıldığı belirtilmektedir. Ayrıca Romalılar döneminde de yara üzerine konulmak için hazırlanan lapa benzeri karışımın içerisine katılarak kullanıldığı bilinmektedir (45).

Propolis seferine çıkan işçi bal arıları propolis toplama işleminde, önce mandibulaları ile propolisi bitkiden çekerek koparır. Ağzında nemlendirip yumuşatarak ve bazı enzimler ekleyerek pellet haline getirir ve pelleti ön bacaklarını kullanarak arka bacaklarındaki polen sepetine aktarır. Propolis yüklü olarak kovana gelen işçi arı ayaklarını kullanarak sıkıca peteğe tutunurken; kovandaki diğer işçi arılar mandibulalarıyla asılarak propolisi taşıyıcı arının polen sepetinden alırlar. Propolisi kovanda dip tahtası, çerçeve kenarları ve giriş deliği arkasında biriktirerek kullanırlar (Şekil 2.3) (46).

Mikroorganizmalara karşı aktivitesi propolisin çok önemli karakteristik bir özelliğidir. Propolis sahip olduğu özelliklerinden dolayı 1960’ların sonundan itibaren bilim adamlarının dikkatini çekmiş ve günümüze kadar propolisin terapötik kullanımı, farmakolojisi, biyolojik aktiviteleri ve kimyasal yapısı üzerine pek çok araştırma yapılmıştır (47).



Şekil 2.3. Propolis elde etmek için çalışan bir bal arısı

### 2.2.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis 10°C altında sert ve kırılğan olup, derin dondurucuya konduğu zaman hemen katılaşır. İstenirse bir öğütücü yardımıyla toz haline getirilebilir. Propolis, 15-25°C arasında mum kıvamında elastik bir yapı göstermektedir; 30-40°C arasında ise yumuşayıp yapışkan bir durum almakta ve bu durum yaz aylarında arıcının çalışmasını güçleştirmektedir. 80°C'de kısmen erir. Kovandan alındığı zaman yapışkan ve kendine özgü bir kokusu olan propolisin rengi; bitki türüne, kaynağına, yaşına bağlı olarak sarıdan koyu kahverengiye kadar değişmektedir. Propolisin rengi, kokusu ve tıbbi karakteri bitkiye, bölgeye, mevsime ve koloniye bağlı olarak değişir. Şeffaf propolisin varlığı da kaydedilmiştir (Şekil 2.4) (48).

Propolis, eter, kloroform, aseton ve diğer organik çözücüler de kısmen, %95'lik alkolde büyük ölçüde çözünmekte, suda çok az çözünmekte veya hiç çözünmemektedir. Etanol dışındaki çözücüler de kullanıldığında propolisden izole edilecek maddelerin farklılaştığı ve birçok bileşenin izole edilemeyeceği görülmüştür (48, 49). Bundan dolayı etanol dışındaki çözücüler çok fazla tercih edilmemektedir. Propolis, tıbbi alanda %70'lik alkolde çözülmüş çözelti olarak kullanılmaktadır (47).



Şekil 2.4. Kovan içinden propolis örneği

### 2.2.2. Propolisin Kimyasal İçeriği

Propolis, farklı kimyasal özellikte bileşikler ve mineral maddeler içeren, oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Kimyasal bileşimi; topladığı bitkiye, bölgeye, mevsime ve koloniye bağlı olarak değişir. Bununla birlikte, ortalama %50 reçine, %30 mum, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen, %5 diğer maddeler ve organik kalıntılardan ibarettir (Tablo 2.7) (50).

**Tablo 2.7.** Propolis bileşenlerinin yüzdesi ve bileşen grupları

Bileşen Sınıfı	Yüzdesi	Bileşen Grubu
Resinler	% 45- 55	Flavonoidler, fenolik asit ve esterler
Mum ve yağ asitleri	% 25- 35	Arı mumu, bitki kaynaklı mum, bitki kaynaklı yağ asitleri
Esansiyel yağlar	% 10	Uçucu bileşenler
Polen	% 5	Polen kaynaklı proteinler, serbest aminoasitler
Diğer organik ve mineral maddeler	% 5	Ketonlar; laktonlar, quinonlar, steroidler, benzoik asit ve esterleri, vitaminler

Propolisin kimyasal içeriği çok komplekstir, Őimdiye kadar 300'den fazla kimyasal madde teŐhis edilmiştir ve propolisin alındığı bitki ve floraya bağlı olarak bu iÇerik farklılık göstermektedir. Propolis iŐeriđindeki bu deđiŐimden dolayı medikal kullanımda ve standardizasyonunda problemler yaŐanmaktadır (51).

Propoliste bulunan bazı mineral maddeler son yıllarda yapılan araştırma sonuŐlarına göre kalsiyum, magnezyum, potasyum, sodyum, demir, bakır, Çinko ve mangan olarak saptanmıştır (50).

Brezilya'dan toplanan propolisin iŐeriđi hakkında yapılan ŐalıŐmalarda, kimyasal bileşimini fenolik bileşikler (flavonoid, aromatik asit ve benzopiran), di- ve triterpenler, aromatik yağların oluşturduğu gösterilmiştir (51).

Araştırmalar flavonoidlerin, tropikal bŐlgedeki ve Avrupa'daki propolis örneklerinde, bitkisel kaynakları farklı olmasına rağmen ortak propolis bileşenleri olduğunu ortaya koymuŐtur (52).

Tropikal bölgelerden elde edilen propolisde bitkisel kaynağı halen aydınlatılamamıŐ bir seri lignan analiz edilmiştir. Kanarya adalarından toplanan propolisde ise 13 ŐeŐit furofuran ŐeŐidi lignan bulunmuştur ve bunların Őođu halen tam olarak analiz edilememiŐtir (53). Brezilya ve Mısır'dan toplanmıŐ propolisde bazı triterpenik alkollere rastlanmıŐtır (54). Ayrıca uÇucu bileşikler, Őekerler, hidrokarbonlar, minerallere de ŐeŐitli propolis örneklerinde rastlanmıŐtır (Tablo 2.8) (55, 56).

**Tablo 2.8.** Propolisin kimyasal bileşenleri ve etkileri

<b>Kimyasal Madde</b>	<b>Etkileri</b>
Flavonoidler	Kılcal damarların geçirgenliğini azaltma ve ateş düşürücü etki Antioksidan, antihemorajik ve antimikrobiyal etki
Krizin	Antitümoral etki ve <i>Helicobacter pylori</i> ' ye karşı etki
Apigenin	Gastrik ülserin iyileştirilmesi
Kuersetin	Antiviral, antitümoral etki ve kılcal damarların güçlendirilmesi
Kempferid	Spazmolitik etki
Kamperol- 7, 4- dimetil eter	Antimikotik etki
Ermani	Antimikotik etki
Galangin	Bakteriyostatik ve antimikotik etki
Pinochembrin	Lokal anestezi etki, antimikotik ve bakteriyostatik etki
Pinobanksin	Antimikrobiyal etki
Pinobanksin- 3- asetat	Antimikrobiyal etki
Pinostrobin	Lokal anestezi etki
3, 4- dihidroksiflavanoidler	Kılcal damarları güçlendirici etki
Flavan- 3- ols	Kılcal damarları güçlendirici etki
Pectolinarinenin	Spazmolitik etki
Luteolin	Antiviral etki, gastrik ülserin iyileştirici etki
Luteolin' in 3, 4 - dimetil eteri	Spazmolitik
Artepillin C	Antitümoral etki
Eriodiktol	Kalp yetmezliği önleyici ve iyileştirici etki
Pinosylvin	Antimikrobiyal etki
Ferulik asit	Antibakteriyel etki, kollagenik etki
Isoferulik asit	<i>Staphylococcus aureus</i> ' a karşı etki
Benzoik asit	Bakteriyostatik, bakterisid ve antiseptik etki
Sinamik asit	<i>Staphylococcus aureus</i> ' a karşı etki
P- kumarik asit benzil ester	Antimikrobiyal etki
Kafeik asit	Ateş düşürücü etki, antiviral ve antibakteriyel etki
Prenil caffeat	Alerjen etki
Metil caffeat	Antitümoral etki
Kafeik asit phenetil ester	Antitümoral etki
Clerodan' ın diterpenoit' i	Antitümoral ve antibakteriyel etki
Uçucu bileşikler	Ateş düşürücü etki ve antimikrobiyal etki

Propolisin biyolojik ve farmakolojik özelliklerini kimyasal bileşimi belirler. Ancak farklı kimyasal içeriğe sahip propolisin aynı aktiviteye hatta bazen aynı yolak üzerinden aynı aktiviteye sebep olması oldukça ilginçtir. Örneğin, propolisin antimikrobiyal özelliğinden, Avrupa propolisinde flavononlar, flavonlar, fenolik asitler ve esterlerin; Brezilya propolisinde p-kumarik asit ve diterpenlerin sorumlu olduğu gösterilmiştir. Evrensel bir standardizasyon işlemi bu nedenle mümkün olmamaktadır. Propolisin içeriğinin detaylıca incelenmesi ve onun botanik kaynağının ve biyolojik etkisinin belirlenmesi gerekmektedir (57).

### **2.2.3. Propolisin Bitkisel Kaynakları**

Arılar propolisi, kuzey kutbunun ılıman bölgelerinde yaz aylarında, sonbahar sonu ile temmuz ayı başlarına kadar olan süreç içerisinde toplamaktadırlar. Brezilya'da ise bu süreç yıl boyu devam eder ancak, mevsime bağlı içerik farklılıkları belirlenmiştir. Bu propolisin, biyolojik olarak aktif içeriği yüksek zamanlarda toplanabileceği sonucunu doğurmuştur. Bununla beraber Afrikan (*Apis mellifera L.*) ve İtalyan (*Apis mellifera ligustica*) arıları yıl boyunca incelenmiş ve oluşturdukları propolisin içeriği ile birlikte farklı biyolojik aktivitelerine bakılmıştır. Sonuçlar, propolisin mevsimlere bağlı olarak içeriğinde değişiklikler olmasına rağmen, biyolojik etkilerinde önemli bir fark olmadığını göstermiştir. Bu durum, arıların propolisi aynı grup bitkilerden ve ağırlıklı olarak da baskın bir bitkiden topladıkları ile açıklanmıştır (58).

Arıların propolis üretimindeki materyallerinin hemen hepsi bitkiler tarafından salgılanmakta ya da bitkilerin sıyrık ve yaralarından akmaktadır. Lipofilik materyaller, yaprak ve yaprak sapları, resinler, musilajlar, sakızlara benzer kısımlardan toplanmaktadır. Bitkisel kaynakların çeşitliliği propolisin kimyasal bileşimini meydana getirmektedir (Tablo 2.9) (56).

**Tablo 2.9.** Bitkisel kökenine ve kimyasal içeriğine göre propolis çeşitleri

Propolis çeşidi	Coğrafi Kökeni	Bitkisel Kaynağı	Biyolojik Olarak Aktif Maddeler
Poplar propolis	Avrupa, Kuzey Amerika, tropik olmayan Asya bölgeleri	<i>Aigeiros</i> dan <i>Populus</i> spp.; en çok <i>P. nigra</i> L.	Flavonlar, flavononlar, sinnamik asitler ve esterleri
Birch propolis	Rusya	<i>Betula verrucosa</i> Ehrh.	Flavonlar ve flavononlar (poplar propolisinden farklı)
Yeşil (alecrim) propolis	Brezilya	<i>Baccharis</i> spp., çoğunlukla <i>B. dracuncifolia</i> DC.	Prenillenmiş <i>p</i> -kumaric asitler, diterpenik asitler
Kırmızı (Clusia) propolis	Küba, Venezuela	<i>Clusia</i> spp.	Poliprenillenmiş benzofenonlar
“Pasifik” propolisi	Pasifik bölgesi (Okinawa, Taiwan)	Bilinmiyor	C-prenilflavanonlar
“Canarian” propolis	Kanarya Adaları	Bilinmiyor	Furofuran lignanlar

Yapılan birçok çalışmada kavak (*Populus* sp.) ve kestane (*Aesculus hippocastanum*) en önemli propolis kaynağı olarak belirtilirken, *Pinus* sp. (Çam), *Betula* sp. (Huş), *Salix* sp. (Söğüt), *Alnus* sp. (Kızılağaç), *Abies* sp. (Göknar), *Prunus* sp. (Erik), *Ulmus* sp. (Karaağaç), *Quercus* sp. (Meşe), *Fraxinus excelsior* (Dişbudak) gibi bitkiler de önemli propolis kaynakları olarak gösterilmektedir (59-61).

*Populus* türü, Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika’yı içine alan ılıman iklimde propolisin ana kaynağıdır. Buradan alınan örnekler benzer kimyasal içerik göstermekle birlikte en önemli içeriğini fenolikler yani flavonoidler, aromatik asitler ve esterleri oluşturmaktadır. Rusya’da propolisin temel kaynağı “*Betula verrucosa*” olup bunun asıl biyolojik aktif kısmını flavonlar ve flavonoller oluşturmaktadır. Küba ve Venezüella’da ise “*Clusia*” türleri ana bitkisel kaynak ve poliprenil benzofenonlar aktif biyolojik bileşimlerdir (57).

Brezilya’da propolisin ana bitkisel kaynağını “*Baccharis dracuncifolia*” oluşturmakta ve bunu “*Eucalyptus citriodora*” ve “*Araucaria angustifolia*” izlemektedir (Şekil 2.5). *Araucaria* ve *Baccharis* yaprakları ve *Eucalyptus* gövdesinden alınan örnekler GC-MS’de incelendiğinde, *B. dracuncifolia* ve propolisdeki dihidrocinnamik asit, *p*-kumarik asit, prenil- ve diprenil kumarik asitler ve flavonoidlerin benzer

konsantrasyonda oldukları görülmüştür. Diğer taraftan *Baccharis* örneklerinde olmayan bazı bileşikler propolisde görülmüştür. *E. citriodora*'nın ana bileşikleri, aromatik asitler, propolisde genellikle mevcut bazı bileşikler ve şekerdir. *A. angustifolia*'da ise az miktarda aromatik asit ve çoğunlukla diterpenik asitlerin bulunduğu gösterilmiştir (62).



**Şekil 2.5.** Bazı propolis kaynağı bitkiler (soldan sağa *Baccharis dracunculifolia*, *Eucalyptus citriodora*, *Araucaria angustifolia*)

Bazı araştırmalar arıların aynı coğrafyadaki propolisin kimyasal bileşiminin değişmediğini, çünkü arıların esasen aynı bitkisel kaynakları ziyaret ettiğini göstermektedir. Örneğin Afrika arıları da Brezilya'da *B. dracunculifolia* bitkisini tercih etmektedir. Bitkinin reçinemsiz borularının ya da iç zardan çıkan reçine kaplı bezlerin, kabuk ve uçucu maddelerin, arıların o bitkiye olan ilgisini arttırdığı bilinmektedir (63).

Bankova ve arkadaşları, propolis içeriğinin belirlenmesi için önce bitki içeriğinin belirlenmesi gerektiğini savunmuştur. Araştırmacılar aynı zamanda aktif bileşikler hakkında bilgi sahibi olmamızın, propolisin standardizasyonunda ve kalite kontrolünde büyük avantaj sağlayacağını vurgulamışlardır (57).

#### **2.2.4. Propolisin Biyolojik Etkileri**

Propolis, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan, antiinflamatuvar, sitotoksik, immünomodülatör, antiülser, lokal anestetik, antitümör, immünostimülatör gibi biyolojik aktiviteleri nedeniyle popüler bir ilaç olarak halk tıbbında, apiterapide, biokozmetikte ve ilaç sanayinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (64).

#### 2.2.4.1. Propolisin Antimikrobiyal Etkileri

Arıların propolisi, gedikleri yamamak ve kovana giren işgalcilerin ölümlerinin bozulmasını engellemek için kullanıldığının anlaşılmasından beri, propolis antimikrobiyal bir ajan olarak kabul görmüştür. Propolis ile ilgili araştırmaların birçoğu antimikrobiyal etkilerinin incelenmesi üzerinedir (54).

Yapılan çalışmalarda, Brezilya propolisinin değişik fraksiyonlarının *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğu ve bu etkinin ana kaynağının polar fenolik bileşimler olduğu gösterilmiştir (54).

Serra ve Escola 12 ayrı propolis örneğinin antibakteriyel etkilerini araştırmışlar, MİK değerlerini *Bacillus subtilis* ve *S. aureus* için 60-80 µg/ml, *Escherichia coli* için 600-800 µg/ml olarak bulmuşlardır. Propolisin gram pozitif mikroorganizmalara, gram negatif mikroorganizmalara göre daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca bu etkiden propolis örneklerinin fenolik içeriğinin ve flavonoid bileşiklerinin sorumlu olduğunu bildirmişlerdir (64).

Propolisin *B. subtilis*, *E. coli*, ve *Rhodobacter sphaeroides*' in fizyolojileri üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, propolisin sinamik asit ve flavonoid içeriğinin sitoplazmik membranda enerji geçişini engellediği ve bakterilerin motilitesini bozduğu ortaya çıkarılmıştır (65).

Hashimoto ve arkadaşları, ham propolis ve propolis fraksiyonlarının, gastrik ülserden sorumlu *H. pylori* üzerine antibakteriyel etkilerini araştırmışlar, propolisin etanolik ekstraktının *H. pylori* üzerine inhibitör etki gösterdiğini ve bu etkiden p-kumarik asit, 3-prenil-4-dihidrosinamoloksisinnamik asit ve artepilin C'nin sorumlu olduğunu rapor etmişlerdir (65). Propolisin *H. pylori* üzerine etkisinin araştırıldığı başka çalışmalarda da bu mikroorganizmaya inhibitör etki gösterdiği ortaya konmuştur. Propolis ve *Zingiber officinale* ekstraktlarının ayrı ayrı klaritromisin ile kombinasyonunun, 25 *H. pylori* klinik izolatu üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bu kombinasyonların *H. pylori* inhibisyonunda sinerjik ya da additif aktivite gösterdiği bildirilmiş ve bu veriye dayanarak propolis ve klaritromisin kombinasyonunun, *H. pylori*'ye bağlı gastroduodenal hastalıkların kontrolüne yardımcı olabileceği vurgulanmıştır (66). Propolisin, bir standart ve 11 klinik *H.pylori* suşu üzerinde antibakteriyel etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada da, propolisin etanolik ekstraktının oldukça etkili olduğu (MİK: 75 µg/mL) bildirilmiştir (67).

Şili'den elde edilen propolisin antimikobakteriyal etkisi ve kimyasal içeriğinin incelendiği bir çalışmada, bu propolisin *Mycobacterium* türlerine karşı etkili olduğu ve bu etkiden asetilviscidon, koniferil aldehit ve dihidrobenzofuran lignan aldehit içeriğinin sorumlu olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu bölge propolisinden, fenilpropan, benzaldehit, dihidrobenzofurana ait 17 fenolik içerik de izole edilmiştir (68).

Castro ve Higashi 1995'de değişik propolis formülasyonlarını *Trypanosoma cruzi* ile enfekte edilmiş fareler üzerinde denemişler, ancak bu parazitin parazitik etkisi üzerine ve farelerin hayatta kalma sürelerine bir etkisi olmadığı sonucuna varmışlardır (69). Ancak *T. cruzi* parazitine karşı, propolisin trypanosidal aktivitesinin araştırıldığı başka çalışmalarda, propolisin çeşitli ekstrelerinin *T. cruzi* amastigotlarına karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalarda, propolisin etanollü ekstresinin farelerde *T. cruzi* parazitemisini ve parazitin intraselüler çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir (70, 71). Özbilge ve arkadaşları 2010'da yaptıkları çalışmada propolisin *Leishmania tropica* paraziti üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda propolisin 32 µg/ml konsantrasyondan itibaren *L. tropica*'ya karşı etkili olduğu ve bu etkinin gerek sayısal azalma, gerekse morfolojik değişim olarak gözlemlendiği, ayrıca yapılan kontroller sonucu üreme olmadığından antileishmanial bir etkinin olduğu sonucuna varmışlardır (72).

Nieva ve arkadaşları, Arjantin'in 4 yerel bölgesinden alınmış propolisin etanolik ekstresinin antibakteriyel aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında, inceledikleri tüm propolis örneklerinin gram-pozitif bakteriler üzerine inhibitör etkili olduğunu ve La Banda Este bölgesinden alınan propolisin özellikle *Streptococcus pyogenes*'e karşı oldukça düşük konsantrasyonda (MİK= 7.8 µg/ml) etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (73). Benzer şekilde, Küba propolisinin de önemli düzeyde antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahip olduğu ve bu aktivitenin izole edilen novel poliisoprenillenmiş benzofenondan kaynaklandığı gösterilmiştir (74).

2000 yılında çeşitli Avrupa ülkelerinden elde edilen propolisin antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış, bileşimi galangin, benzil ferulat, fenil etil trans kafeatlardan oluşan Alman propolisinin *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı en etkili propolis türü olduğu, ana kaynağını pinocembrinin oluşturduğu Avusturya propolisinin ise *Candida albicans*'a karşı en etkili propolis türü olduğu bildirilmiştir (75).

Türkiye'de de değişik bölgelerden elde edilen propolisin antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Keskin ve arkadaşları çeşitli bölgelerden elde ettikleri

propolisin, Gram pozitif bakterilere karşı oldukça etkili olduğunu, ancak bu etkinin Gram negatif bakterilere karşı düşük düzeyde olduğunu rapor etmişlerdir (76). Silici ve arkadaşları, Orta Anadolu propolisinin etanollü ekstresinin *S. aureus* bakterisine karşı yüksek antibakteriyel aktivite, *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*' a karşı zayıf aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (77). Ayrıca ülkemizde farklı illerden elde edilen propolis örneklerinin, *S. aureus* ve *E. coli*' ye karşı oldukça güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (78).

#### **2.2.4.2. Propolisin Antitümöral Etkileri**

Propolisin in vivo ve in vitro olarak antitümöral aktivitesinin araştırıldığı çok sayıda çalışma rapor edilmiştir (79, 80).

Matsuno ve arkadaşları, Brezilya propolisinden yeni bir clerodan diterponoidi olan PMS-1 i izole etmişler ve PMS-1'in tümör hücrelerini S fazında yakalayıp hepatoma hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar, suda çözülmüş propolis ekstraktlarından PRF-1 adını verdikleri, antioksidan aktivite gösteren ve insandaki hepatosellüler karsinomaya, HeLa'ya ve insan akciğer karsinoma HLC-2 hücrelerine karşı sitotoksik etki gösteren bir propolis etken maddesi izole etmişlerdir. Aynı zamanda izole ettikleri bu bileşiğin, *Baccharis* bitkisi türlerinden alınan ve tümörüsiz etki gösteren artepillin C' ye benzer özelliklere sahip olduğunu ve sitotoksitesini DNA fragmentasyonundaki apoptoza etki ederek gösterdiğini bildirmişlerdir (79).

Suzuki ve arkadaşları farelerde oluşturulan Ehrlich karsinomasına karşı propolisin antitümöral aktivitesini belirlemek üzere, propolisi antitümöral ilaçlarla kombine ederek tedavide kullanmışlardır. Ehrlich karsinomalı farelere propolis ve antitümöral ilaçları kombine bir şekilde subkutan olarak vermişler ve tümör hücrelerinde önemli düzeyde inhibisyon oluştuğunu ve hatta bazı deneklerde tümör hücrelerinin yok olduğunu kaydetmişlerdir. Talai ve arkadaşları da ICR erkek fareleri subkutan olarak Ehrlich ascites karsinoma hücreleri ( $4-8 \times 10^6$  hücre/ml) ile aşılamışlar, bir grup fareyi sadece 5-fluorourasil ile (1 mg/kg/gün), bir grup fareyi de 5-fluorourasil ile birlikte propolis kombinasyonu ile (13 mg/kg/gün) 5 hafta boyunca tedavi etmişlerdir. Sonuç olarak, propolisin farelerde lenfosit üretimini artırarak immün sistemi geliştirdiğini ve 5-fluorourasilin antitümör etkinliğini arttırdığını rapor etmişlerdir (52).

Makrofajlar antitümoral tepkide, hem antikora bağlı hücrel sitotoksitedeki rolüyle, hem tümör hücrelerinin büyümesine karşı inhibe edici sitokin salgılamasıyla hem de reaktif oksijen ve nitrogen mekanizmasındaki rolüyle önemli bir rol oynamaktadırlar. Makrofajların antitümoral aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, tümör oluşturulmuş farelere günlük 50 mg/kg dozda propolis uygulandığında makrofajlardan daha yüksek oranda lenfosit aktive edici faktör üretiminin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu yolla insan servikal karsinoma hücreleri (HeLa) ile Çin hamsterlarının akciğer fibroblastlarını (V79) inhibe ettiği kaydedilmiştir. Propolisin farelerde poliklonal mitojenlere karşı yükselmiş splenosit aktiviteye sebep olduğu da bildirilmiştir (79).

#### **2.2.4.3. Propolisin Antioksidan Etkileri**

Oksidanlar, fagosite edilmiş mikroorganizmalar ve yıkılmış önemli biyomoleküller sonucu fagositozla ortaya çıkar ve doku hasarlarına ve enflamasyona sebep olur (80). Glutasyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz gibi antioksidanlar, oksidanların sebep olduğu hasarı azaltmak ve bu hasara karşı koruyuculuk yapmaktadırlar. Askorbik asit (vitamin C) ve tokoferol (vitamin E) ise non-enzimatik antioksidanlardır. Antioksidan ajanların üretimi ve yıkımı arasında organizmaya yarar ve zarar sağlayabilecek çok ince bir denge vardır (52).

Propolisin, antioksidan aktiviteye sahip flavonoid ve fenolik bileşimlerden zengin olduğu bilinmektedir. Bu nedenle propolisin, oksidanların yıkıcı etkilerinden bizi koruduğu bildirilmektedir. Propolisin antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, Brezilya propolisinin serbest radikallere karşı, vitamin C, vitamin E, kafeik asite göre daha potansiyel bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (81).

Basnet ve arkadaşları, Brezilya propolisinin sulu çözeltilerinden potansiyel antioksidanları izole etmişler ve bunlara 'propol' adını vermişlerdir. Propolün, vitamin C ve vitamin E'den daha güçlü bir antioksidan etki gösterdiğini, hem propolisin hem de propolün sulu çözeltilerinin  $Cu^{+2}$  yi inhibe ettiğini ve düşük LDL oksidasyonuna sebep olduğunu kaydetmişlerdir (82).

Bir başka çalışmada, sardunya propolisinin saturasyona uğramamış polilipidik sistemlerdeki antioksidan etkisi incelenmiş ve propolis çözeltilerinin vitamin E'den daha güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur. Benzer bir şekilde Çin, Avusturya, Yeni Zelanda, ve Japon propolislerinde de güçlü antioksidan kapasite

tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda hemen her propolis örneğinde  $\alpha$ -tokoferolün bulunduğu ve propolisin antioksidan etkisi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (83).

Sun ve arkadaşları, vitamin E'den yoksun sıçanlara propolis uygulamışlar, bu sıçanlarda böbreklerde ve bağırsaklarda vitamin C konsantrasyonunun kontrol grubuna göre normalden daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle propolisin bazı etken maddelerinin, kanda absorblanarak hidrofilik antioksidanlar ve depolanmış vitamin C gibi davrandığı sonucuna ulaşılmıştır (84).

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1 BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI

#### 3.1.1. Kanlı Brucella Agar Besiyerinin Hazırlanması

##### İçeriği (g/L):

Pepton.....	10.0
Kazein.....	10.0
Maya Özütü.....	2.0
D(+) Glukoz.....	1.0
NaCl.....	5.0
Agar.....	13.0

Brucella Agar besiyeri (Merck, Almanya) üretici firmanın tarifine uygun miktarlarda tartılarak balon joje içine konuldu. Bunun üzerine uygun miktarda distile su konularak eriyene kadar 50°C' ye ayarlanmış benmari (Nüve, Türkiye) içinde bekletildi. Daha sonra besiyeri otoklavda (Hirayama, Japonya) 121°C' de 15 dakika tutularak steril edildi. Oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Besiyeri 45-50°C' ye soğuyunca %5 oranında steril fibrinsiz koyun kanı ilave edilip karıştırıldı ve laminar akımlı emniyet kabini (Nüve, Türkiye) içerisinde steril petrilere dökülerek donmaya bırakıldı. Besiyerleri çalışılncaya kadar + 4°C' de buzdolabında saklandı.

### 3.1.2. Kanlı Mueller-Hinton Agar (KMHA) Besiyerinin Hazırlanması

#### İçeriği (g/l):

Et Özü.....	2.0
Kazein hidrolizat.....	17.5
Nişasta.....	2.0
Agar.....	13.0

Mueller-Hinton Agar besiyeri (Merck, Almanya) ticari toz besiyerinden üreticinin tarif ettiği şekilde hazırlandı. Otoklavda 121°C' de 15 dakika sterilize edildi. Oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Besiyeri 45-50°C' ye soğuyunca %5 oranında steril fibrinsiz ve  $\geq 2$  haftalık koyun kanı eklendi. Disk difüzyon testinde kullanmak üzere 100 mm'lik petri kutularına 25-30 ml dökülerek 4 mm kalınlıkta besiyerleri hazırlandı. Agar dilüsyon yöntemi için ise, KMHA besiyeri 45-50°C' ye soğuyunca hazırlanan propolisin etanolik ekstraktının her bir konsantrasyonundan eklenerek ayrı ayrı petrilere döküldü. Oda sıcaklığında donmaya bırakıldı.

### 3.1.3. Trypticase Soy Broth (TSB) Besiyerinin Hazırlanması

#### İçeriği (g/l):

Pepton.....	3.0
Kazein.....	17.0
D(+) Glukoz.....	2.5
NaCl.....	5.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2.5

TSB besiyeri (Merck, Almanya) ticari toz besiyerinden üreticinin tarif ettiği şekilde hazırlandı. Otoklavda 121°C' de 15 dakika sterilize edildi. Oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Besiyeri çalışılncaya kadar + 4°C' de buzdolabında saklandı.

## 3.2. MİKROORGANİZMANIN HAZIRLANMASI

### 3.2.1. Mikroorganizmanın Eldesi

*H. pylori* suşu Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu'ndan (RSKK 10004) elde edildi.

### 3.2.2. Mikroorganizmanın Üretilmesi

RSKK' dan gönderilen stok kültür, 0.5-1 ml TSB ile sulandırıldı. %5 fibrinsiz koyun kanlı brucella agar besiyerine ekildi. 37°C' de mikroaerofilik ortamda ( %5 O<sub>2</sub>, %10 CO<sub>2</sub>, %85 N<sub>2</sub>) 4-7 gün inkübe edildi (85).

### 3.3. PROPOLİS ELDESİ

#### 3.3.1. Propolis Eldesi ve Ekstraksiyonu

Çalışmada, propolisin etanol ile hazırlanan ekstresi kullanıldı. Kayseri bölgesinden toplanan ve toz haline getirilen 30 g propolis, %80' lik 100 ml etanol içerisinde 1 hafta boyunca ekstrakte edildi. Daha sonra Whatmann A4 filtre kağıdından süzülerek vakum evaporatör ile alkolü buharlaştırıldı. Oluşan propolis ekstresi deney aşamasına kadar koyu renkli plastik kutularda buzdolabında saklandı.

#### 3.3.2. Propolis Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Propolisin etanollü ekstresinden 820 mg tartılarak 1 ml absölu etanolde çözüldü. Etanolde çözülmüş olan bu propolis çözeltisi, çapı 0,2 µm olan steril membran filtreden süzülerek steril hale getirildi. Bu ana stok solüsyonundan aşağıdaki formül kullanılarak %10 etanol içeren distile suda 2048 µg/ml propolis konsantrasyonu elde edildi.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Propolisin 2048 µg/ml konsantrasyonundan aynı formül yardımı ile 16-1024 µg/ml arasında ikişer kat propolis konsantrasyonları hazırlandı. Böylece elde edilen konsantrasyonlardaki etanol içeriği %0.07-5 arasına düşürülmüş oldu.

### 3.4. DUYARLILIK TESTLERİ

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), *H. pylori*'nin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde agar dilüsyon yöntemini önermektedir (86). Çalışmamızda propolisin *H. pylori* üzerine antimikrobiyal etkinliğinin araştırılmasında disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemleri kullanılmıştır.

### 3.4.1. Disk Difüzyon Testi

#### 3.4.1.1. Propolis Disklerinin Hazırlanması

Steril, antibiyotik emdirilmemiş, 6 mm çapında antimikrobiyal duyarlılık test diskleri (Oxoid, İngiltere) buzdolabından çıkarılarak oda ısısına getirildi. Propolis, aşağıdaki formül kullanılarak disklerde son konsantrasyonu 16-1024 µg/ml aralığında ikişer kat konsantrasyonlarda olacak şekilde disklerle 20' şer µl emdirildi.

$$\text{İstenilen disk içeriği (µg /ml) / Diske emdirilen miktar (µl) = Stok konsantrasyon (µg /ml)}$$

Propolis emdirilen diskler çözücünün uzaklaşması amacıyla bir gece kurumaya bırakıldı.

#### 3.4.1.2. Bakteri İnokülumunun Hazırlanması

*H. pylori* inokülumu, CLSI önerileri doğrultusunda, koyun kanlı brucella agar besiyerinde üremiş kolonilerinden serum fizyolojik içerisinde türbidometre cihazı (BD, PhoenixSpec, Nephelometer, USA) kullanılarak 2.0 McFarland ( $1 \times 10^7$  -  $1 \times 10^8$  CFU/ml) standart bulanıklığa ayarlandı (Şekil 3.1) (86).



Şekil 3.1. Türbidometre cihazı

#### 3.4.1.3. Testin Yapılışı

2.0 McFarland standart bulanıklığa ayarlanan bakteri süspansiyonu, KMHA besiyeri yüzeyine steril eküvyon yardımıyla inoküle edildi. Plaklar 2-3 dk kurumaya bırakıldı. Propolis emdirilmiş diskler bu besiyerleri üzerine yerleştirildi. Ayrıca çözücünün

inhibitör etkisinin olup olmadığının gösterilmesi amacıyla propolis içermeyip sadece etanol emdirilen diskler de besiyerine konuldu. Plaklar 37°C' de mikroaerofilik ortamda 5 gün inkübe edildi (87). İnkübasyon sonunda propolis diskleri ve çözücü kontrol diski etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü. Test iki kez tekrar edildi.

### **3.4.2. Agar Dilüsyon Testi**

#### **3.4.2.1. Besiyerinin Hazırlanması**

Otoklavda sterilize edilen MHA besiyerine 45-50°C' ye soğuyunca %5 oranında steril fibrinsiz ve  $\geq 2$  haftalık koyun kanı eklendi. Propolisin 16-1024 µg/ml aralığında iki kat konsantrasyonları bu besiyerine eklenerek her bir konsantrasyon için ayrı ayrı ve kalınlığı 4 mm olacak şekilde petrilere döküldü. Ayrıca üreme kontrolü amacıyla propolis içermeyen KMHA besiyeri de hazırlandı.

#### **3.4.2.2. Bakteri İnokülumunun Hazırlanması**

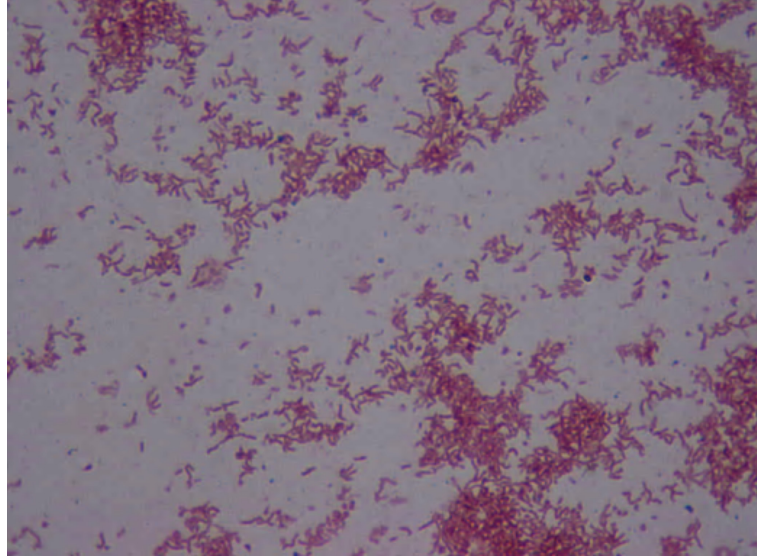
*H. pylori* inokülumu, CLSI önerileri doğrultusunda, koyun kanlı brucella agar besiyerinde üremiş kolonilerinden serum fizyolojik içerisinde türbidometre cihazı kullanılarak 2.0 McFarland standart bulanıklığa ayarlandı.

#### **3.4.2.3. Testin Yapılışı**

Propolis içeren agar dilüsyon plaklarına ve üreme kontrol besiyerine, hazırlanan bakteri inokülumundan son konsantrasyon  $10^4$  CFU/ damla olacak şekilde 1-3 µl/damla nokta ekimi yapıldı. Plaklar 37°C' de mikroaerofilik ortamda 3 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üremenin inhibe edildiği en düşük konsantrasyon kantitatif olarak saptandı. Bu değer minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak belirlendi (86).

## 4. BULGULAR

Elde edilen *H. pylori* stok suşu TSB ile sulandırılarak %5 fibrinsiz koyun kanlı brucella agar besiyerinde üretildi. Üreyen kolonilerin gram boyama görüntüsü Şekil 4.1' de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *Helicobacter pylori*'nin gram boyama görüntüsü

Çalışmada Kayseri bölgesinden elde edilen propolisin, *H. pylori* üzerine antimikrobiyal etkisi araştırıldı. Bu amaçla disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemleri uygulandı.

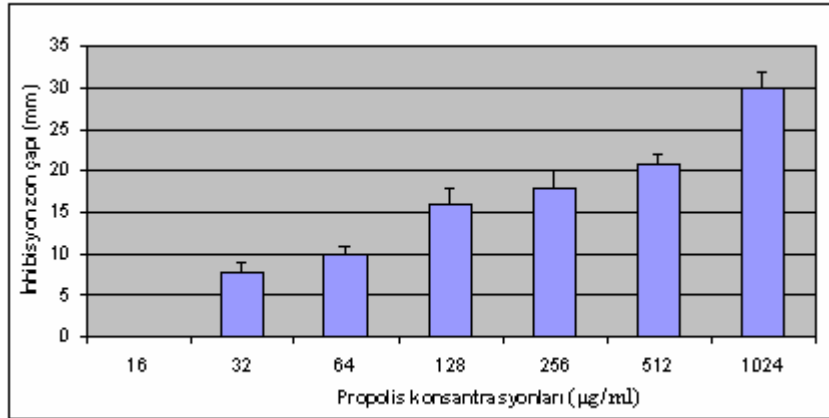
#### 4.1. DİSK DİFÜZYON YÖNTEMİ

Bakteri inoküle edilmiş ve propolis diskleri yerleştirilmiş KMHA plakları 37°C’de mikroaerofilik ortamda 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda propolis diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları Tablo 4.1’ de ve grafiği Şekil 4.2’ de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.** Disk difüzyon testinde propolis diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları (mm\*)

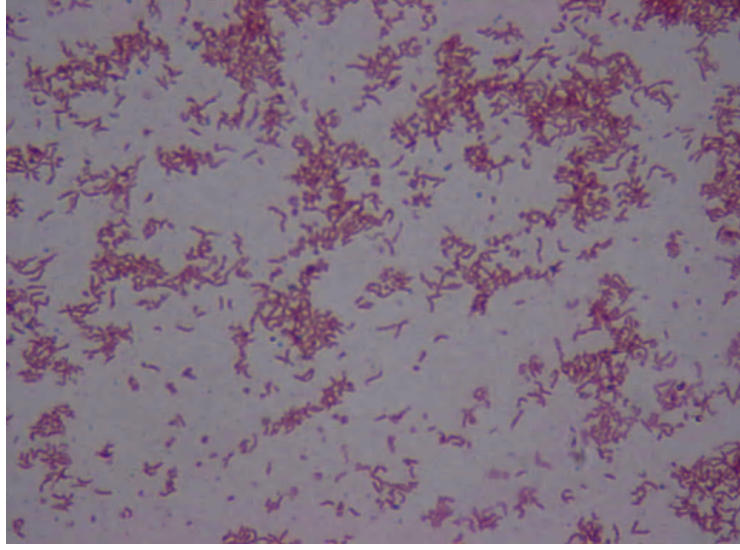
Propolis Konsantrasyonları (µg/ml)	16	32	64	128	256	512	1024
İnhibisyon Zon Çapı (mm)	0	8±1	10±1	16±2	18±2	20±1	30±2

\*mm: milimetre



**Şekil 4.2.** Disk difüzyon testinde artan propolis konsantrasyonlarına göre inhibisyon zon çaplarının grafiği

Çözücü emdirilen disk etrafında inhibisyon zonu gözlenmedi (negatif kontrol). Bu disk çevresinden yapılan gram boyama görüntüsü Şekil 4.3’ te gösterilmiştir.



**Şekil 4.3.** Çözücü emdirilen disk çevresinden gram boyama görüntüsü

#### 4.2. AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ

Propolis içeren KMHA plaklarına ve üreme kontrol besiyerine yapılan *H. pylori* ekimleri, uygun inkübasyon koşulları ve süresi sonunda üreme yönünden değerlendirildi.

Propolisin 16, 32 ve 64 ( $\mu\text{g/ml}$ ) konsantrasyonlarında üreme gözlenirken, 128  $\mu\text{g/ml}$  ve üzeri konsantrasyonlarda üreme gözlenmedi. MİK değeri 128  $\mu\text{g/ml}$  olarak değerlendirildi. Üreme kontrolü amacıyla hazırlanan propolis içermeyen KMHA besiyerine yapılan ekimde, belirtilen inkübasyon sonunda üreme gözlemedi.

**Tablo 4.2.** Agar dilüsyon testinde artan propolis konsantrasyonlarına göre *Helicobacter pylori*'nin üreme durumu

Propolis Konsantrasyonları ( $\mu\text{g/ml}$ )	16	32	64	128	256	512	1024
Üreme	Var	Var	Var	Yok	Yok	Yok	Yok

Ayrıca çözücünün mikroorganizma üzerine inhibisyon etkisini belirlemek amacı ile her bir propolis konsantrasyonunda bulunan çözücü oranını (%5 - 0.07 arasındaki her bir dilüsyon için ayrı plak) içeren KMHA besiyerlerine yapılan ekimler de, uygun

inkübasyon koşulları ve süresi sonunda üreme yönünden değerlendirildi. Çözücünün bu oranlarda mikroorganizma üzerine inhibitör etkisi gözlenmedi.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sentetik ilaçların yan etkileri ve bu ilaçlara mikroorganizmaların giderek daha fazla direnç geliştirmeye başlamaları nedeniyle, son yıllarda özellikle infeksiyon hastalıklarının tedavisinde bitki ve doğal ürünlerden yararlanma çalışmaları hızlanmış ve dünyanın çeşitli bölgelerinden toplanan bitkilerden elde edilen ekstrelerin mikroorganizmalar üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar yoğunluk kazanmaya başlamıştır (88, 89).

*H. pylori* dünyanın en yaygın infeksiyonuna neden olan mikroorganizmalardan biridir ve dünya popülasyonunun ortalama %60' ının bu bakteri ile infekte olduğu bilinmektedir (27). *H. pylori*, prevalansı yüksek ve prekanseröz bir bakteri olması nedeniyle tanı ve tedavisi zorunlu bir bakteridir (90). Günümüzde kullanılan tedavi yöntemlerinin *H. pylori* infeksiyonunu %70-90 oranlarında tedavi ettiği bildirilmekle birlikte, ülkemizde son dönemde yapılan çalışmalarda bu oranlar %46 ve %56 gibi çok daha düşük düzeydedir (42). *H. pylori* tedavisindeki başarısızlığın en önemli sebebinin antibiyotik direnci olduğu belirtilmektedir ve direnç oranları her geçen gün artmaktadır (43). Bu durum araştırmacıların doğal tedavi yöntemlerine yönelmesini sağlamıştır. Son yıllarda çeşitli doğal kaynakların ve bitki ekstralarının *H. pylori*' ye karşı antimikrobiyal aktivitelerinin araştırıldığı çalışmalar oldukça artmıştır (91, 92).

Ülkemizde “biberiye” olarak bilinen *Rosmarinus officinalis* bitkisinin yapraklarından elde edilen ekstrenin *H. pylori*’ye karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiş ve MİK değeri 25 µg/ml olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada ülkemizde “hint safranı” olarak bilinen *Curcuma longa* ve “zencefil” olarak bilinen *Zingiber officinale* rizomlarının metanollü ekstraktlarının de antihelikobakter aktiviteleri araştırılmış ve MİK değerleri sırasıyla 50 µg/ml ve 25 µg/ml olarak bulunmuştur (92).

Mahady ve arkadaşları, 15 farklı *H. pylori* klinik izolatu üzerinde yaptıkları in vitro çalışmada, *Myristica fragrans* (küçük Hindistan cevizi)’in tohumlarından elde edilen ekstrenin MİK değerini 12.5 µg/mL olarak bulmuşlar ve oldukça etkili olarak rapor etmişlerdir (92).

Halk arasında “Peygamber çiçeği, zerdali diken” olarak bilinen *Centaurea L.* cinsine ait türlerin araştırıldığı bir çalışmada, bu türlerin klinik olarak izole edilmiş *H. pylori* suşlarının %50’sine karşı yüksek aktivite gösterdiği (MİK: 1.95 µg/ml - 250 µg/ml) in vitro çalışmalarla gösterilmiştir (93). Benzer şekilde Ramos ve arkadaşlarının yapmış olduğu soğanın antibakteriyel etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, soğanın sulu ekstresinden izole edilen bileşiklerin (3-(kuersetin-8-il)-2,3-epoksi flavon) *H. pylori*’ye karşı inhibitör etkisi olduğu in vitro olarak gösterilmiştir (94).

Türkiye’de böğürtlen olarak tanınan ve antiinflatuar ve antimikrobiyal özellikleri bilinen *Rubus ulmifolius*’un, yapraklarından elde edilen ekstrenin, CagA pozitif ve CagA negatif *H. pylori*’ye karşı sırasıyla 1500 ve 1200 µg/ml MİK değerlerinde antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (95). Çeşitli bal örneklerinin antibakteriyel etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada bu ürünlerin, *H. pylori*’nin de dahil olduğu birçok mikroorganizmaya (*Escherichia coli*, *H. pylori*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pyogenes*) karşı oldukça etkili oldukları rapor edilmiştir (91).

*H. pylori* eradikasyonunda mevcut tedaviyi desteklemek ya da doğal tedavi rejimleri oluşturabilmek amacıyla bitkiler ve doğal ürünler üzerinde yapılan örnekleri verilen bilimsel çalışmalar arttırılabilir. Son yıllarda antihelikobakter etkili bileşik ya da ürünlerin araştırıldığı çalışmalarda propolisin de mevcut olduğu dikkatleri çekmektedir. Propolis, immünmodülatör, antimikrobiyal, antioksidan, antitümöral etkilerinden dolayı yiyecek ve içeceklerde ve halk tıbbında kullanılan bir doğal üründür (96). Propolisin *H.*

*pylori* üzerine in vitro olarak etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, bu ürünün toplandığı coğrafik bölgelere göre etkinliğinin değiştiği görülmektedir. Araştırmacılar toplandığı iklim, bitki türü, coğrafik bölge ve arı türüne bağlı olarak propolisin kimyasal içeriğinin ve böylece biyolojik aktivitesinin değişebildiğini rapor etmişlerdir (97, 98).

Boyanova ve arkadaşları, Bulgaristan'da toplanan propolisin 38 ayrı *H. pylori* klinik izolatının üremesine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, propolisin %30 etanolik ekstraktını kullanmışlar ve kontrol olarak kullandıkları etanole göre propolisin, bu suşların üremesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Sonuçta Bulgar propolisinin *H. pylori*'ye karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır (99). Aynı araştırmacılar aynı bölgeden toplanan propolisin *H. pylori* üremesine etkilerini araştırdıkları daha geniş çaplı bir çalışmada, bu propolisin 94 izolat üzerinde inhibitör etkisini, kontrol olarak kullandıkları etanole göre istatistiksel olarak anlamlı bulmuş ve daha ileri mikrobiyolojik, farmakolojik ve klinik çalışmaların gerekliliğine dikkat çekmişlerdir (98).

Coelho ve arkadaşlarının Brazilian green propolisin, *H. pylori* enfeksiyonlu 18 kişi üzerinde etkilerini araştırdıkları klinik bir çalışmada, hastaları 7 gün boyunca günde 3 kez 20'şer damla propolisle tedavi etmeye çalışmışlar ve *H. pylori*'nin eradikasyonu açısından takip etmişlerdir. Tedavi sonrası 40. günde üre nefes testi ile değerlendirdikleri hastalarda düşük bir başarı oranı elde etmişler ve bu konuda daha geniş çaplı ve uzun süreli çalışmalara ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir (100).

*H. pylori* enfeksiyonlarının tedavisinde antibiyotikleri desteklemek ya da alternatif bir tedavi oluşturmak amacıyla Nostro ve arkadaşları, 17 farklı bitki ekstraktının bir standart ve 11 klinik *H. pylori* suşu üzerinde antibakteriyel etkisini araştırmışlar ve özellikle *Cuminum cyminum L.* ve propolisin etanolik ekstraktlarının oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada *H. pylori*'nin duyarlılığının saptanmasında öncelikle disk difüzyon testi uygulanmış ve disk çapından daha büyük inhibisyon zonu gösteren ekstraktların MİK değerlerini belirlemek üzere agar dilüsyon testi yapılmıştır. Buna göre propolisin etanolik ekstraktının (8 mg/disk) inhibisyon zon çapı 20mm ve MİK değeri 75 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu ürünlerin in vitro etkilerinin *H. pylori* enfeksiyonlarının tedavisinde yeni ve güvenilir tedavi rejimleri oluşturulmasında dikkate alınması gerektiğini ve bu amaçla klinik çalışmalara ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir (67).

Propolis ve *Zingiber officinale*'nin etanolik ekstraktlarının ayrı ayrı klaritromisin ile kombinasyonunun, 25 *H. pylori* klinik izolatu üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bu kombinasyonların *H. pylori* inhibisyonunda sinerjik ya da additif aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Propolisin etanolik ekstraktının tek başına *H. pylori* izolatları üzerine MİK aralığı 10-80 µg/ml olarak belirlenirken, aynı ekstrenin klaritromisin ile kombinasyonunun MİK aralığı 2.5-40 µg/ml olarak bulunmuştur. *Zingiber officinale*'nin etanolik ekstraktları için bu değerler sırasıyla 10-160 µg/ml ve 2.5-40 µg/ml olarak bildirilmiştir. Bu verilere dayanarak klaritromisinin, propolis veya *Zingiber officinale* ile kombinasyonunun *H. pylori*'ye bağlı gastroduodenal hastalıkların kontrolüne yardımcı olabileceği vurgulanmıştır (66).

Hashimoto ve arkadaşları, ham propolis ve propolis fraksiyonlarının, gastrik ülserden sorumlu *H. pylori* üzerine antibakteriyel etkilerini araştırmışlar, propolisin etanolik ekstraktının *H. pylori* üzerine inhibitör etki gösterdiğini ve bu etkiden p-kumarik asit, 3-prenil-4-dihidrosinamoloksisinamik asit ve artepilin C'nin sorumlu olduğunu rapor etmişlerdir (65).

Propolisin biyolojik aktivitesini, propolisin toplandığı coğrafik bölge, o coğrafik bölgenin bitki örtüsü, iklim ve propolisin taşındığı kovanın bulunduğu alan gibi faktörler büyük ölçüde etkilemektedir. Bu çalışmada Kayseri ve çevresinden toplanan propolisin *H. pylori*'ye in vitro etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla propolisin etanolik ekstraktı hazırlanmış ve antimikrobiyal duyarlılık testleri olarak disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemleri kullanılmıştır. Disk difüzyon testine göre 64 µg/ml ve üzeri konsantrasyonlarda belirgin inhibisyon zon çapları gözlenirken, agar dilüsyon yönteminde minimal inhibitör konsantrasyon 128 µg/ml olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar değişik bölgelere ait propolisin *H. pylori*'ye karşı 10-300 µg/ml arasında MİK değerlerinin değiştiği ve etkinliğinin doza bağımlı olarak arttığı rapor edilmiştir (67, 98). Bizim çalışmamızda da propolisin düşük dozda antihelikobakter aktivite gösterdiği ve bu etkinin doza bağımlı olarak arttığı tespit edilmiştir.

Propolisin içerdiği maddelerin çeşidi ve miktarı toplandığı bitkilerin kaynağına göre değişmektedir. Propolisin kimyasal formülü bu yüzden sabit değildir (48). Fitokimyasal çalışmalar propolisin başlıca fenolik bileşikler, flavonoidler, terpenler, aromatik aldehytler ve alkoller olmak üzere çeşitli bileşiklerden oluştuğunu göstermektedir. Propolisin değişen içeriği biyolojik etkinliğini de etkilemektedir. Bu çalışmada çalışılan

propolisin Silici ve Koç tarafından GC-MS analizi yapılmış ve ana bileşiklerinin flavonoidler, aromatik ve yağ asitleri ile alkol ve ketonlardan oluştuğu gösterilmiştir (101). Çalışmamızda kullandığımız propolisin etanollü ekstresinin kimyasal bileşenlerinden olan flavonoidlerin yüksek miktarda olması nedeniyle antihelikobakter etkisinin bununla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bu konuda ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak Kayseri ve çevresinden toplanan propolisin *H. pylori*'ye etkili olduğu gösterilmiş olup, bu çalışmanın propolisin *H. pylori* eradikasyonunda kullanımı ile ilgili deneysel ve klinik çalışmaların önünü açacağı düşünülmüştür.

## 6. KAYNAKLAR

1. Özden A. *Helicobacter pylori* 2006 “WGO-OMGE Practice Guideline” ve “Maastricht III Florence Consensus Report 2005”. Güncel Gastroenteroloji 2006; 10(4): 287-291.
2. Sanders CJ, Yu Y, Moore DA, Williams IR, Gewirtz AT. Humoral immune response to flagellin requires T cells and activation of innate immunity. J Immunol 2006; 177: 2810-2818.
3. Asaka M. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. Internal Medicine 2002; 41(1): 1-6.
4. Pandey R, Misra V, Misra SP, Dwivedi M, Kumar A, Tiwari BK. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. Asian Pac J Cancer Prev 2010; 11(3): 583-588.
5. Duck WM, Sobel J, Pruckler JM, Song Q, Swerdlow D, Friedman C, et al. Antimicrobial resistance incidence and risk factors among *Helicobacter pylori* infected persons, United States. Emerg Infect Dis 2004; 10(6): 1088-1094.
6. Bankova V, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie 2000; 31: 3-15.
7. Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SA, Dandiya PC. Antibacteriyal, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. J Ethnopharmacol 1991; 35: 77-82.

8. Özdemir R. Gastroskopi yapılan hastaların dışkı örneklerinde tedavi öncesi ve sonrası *H. pylori* antijeninin ELİSA yöntemi ile araştırılması, Uzmanlık Tezi, İstanbul 2006; 6-30.
9. Yılmaz YA. *Helicobacter pylori*: Mikrobiyolojik tanı yöntemleri. Hacettepe Tıp Dergisi 2004; 35: 182-186.
10. Gürsoy O, Kınık Ö. Probiyotik bakterilerin klinik uygulamalarında yeni gelişmeler-II. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 2006; 43(1): 189-196.
11. Bingöl R. *H.pylori* Mikrobiyolojisi. 9. Türk Klinik ve Mikrobiyoloji Kongresi, 3-9 Kasım 1999 Antalya, Kongre Kitabı. s. 51-55.
12. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984; 16: 1311-1315.
13. Altındiş M, Özdemir M. *Helicobacter pylori* ve tanısı. Kocatepe Tıp Dergisi 2003; 2: 1-12.
14. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M and Collins MD: Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. Int J System Bacteriol 1989; 39: 397-405.
15. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji. Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, 10. Baskı, İzmir; 2000. s: 143-146.
16. Windsor HM, O'Rourke J. Bacteriology and toxonomy of *H.pylori*. Gastroenterology Clinics of North America 2000; 29(3): 633-649.
17. Goodwin CS and Worsley B W: Microbiology of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology Clinics of North America 1993; 22: 5-19.
18. Özden A, Bağlan P.H. *Helicobacter pylori*' nin antibiyotiklere direnci. Güncel Gastroenteroloji Dergisi 2003; 220-225.
19. Current Opinion In Gastroenterology (2006). Citation Guide. [[http://www.turkiyeklinikleri.com/abstract\\_tr.php?id=45114](http://www.turkiyeklinikleri.com/abstract_tr.php?id=45114)] Erişim Tarihi: 20 Ağustos 2010.
20. Tünger Ö. *Helicobacter pylori* infeksiyonları. Turkish Journal of Infection 2008; 22 (2): 107-115.

21. Ergür E. Farengeal ve palatin tonsillerde hızlı üreaz testi ve immünohistokimyasal analiz yöntemiyle *helicobacter pylori* kolonizasyonunun araştırılması, Uzmanlık Tezi, İstanbul 2006; 2-4.
22. Erdem B. *Campylobacter* ve *Helicobacter pylori*. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji kitabından, Güneş Kitabevi, Ankara. 1999: 536-539.
23. D'Elios MM, Amedei A, Del Prete G. *Helicobacter pylori* antigenspesific T- cell responses at gastric level in chronic gastritis, peptic ulcer, gastric cancer and low-grade mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Microbes and Infection* 2003; 5: 723-730.
24. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manuel of Clinical Microbiology* (9. ed). Çeviri: Başustaoğlu A. Bölüm Çeviri: Akyön Y. *Helicobacter*. Kitap: Klinik Mikrobiyoloji. Atlas Kitapçılık, Ankara 2009; ss 947-962.
25. Demiray M, Manavoğlu O. *Helicobacter pylori* ve gastrik karsinogenez. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2003; 29(2); 29-33.
26. Uzunismail H. *Helicobacter pylori* ve eradikasyon. Gastrointestinal sistem hastalıkları sempozyumu İstanbul, 11-12 Ocak 2001: 19-26.
27. Kadanalı A, Özkurt Z. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu: Epidemiyoloji, patogenez ve ilişkili hastalıklar, *Klinik Dergisi* 2004; 3: 146-150.
28. Sivri B. Peptik Ülser Tedavisinde Yenilikler, Güneş Kitabevi, Ankara 1999; ss 72-88.
29. Erikoğlu M, Yol S, Tavlı K, et al. Mide kanserleri: 15 yıllık deneyimlerimiz. *Genel Tıp Dergisi* 2005; 15(2): 71-75.
30. Karasu Z, Akarca US, Ersöz G, et al. Mide kanserinde *Helicobacter pylori* enfeksiyonu; kanser dokusunda bakteri varlığının PCR ile belirlenmesi, *T Klin Gastroenterohepatol* 2001; 12: 1-7.
31. Erdem L, Akbayır N, Sakız D, et al. Dispepsili hastalarda midenin prekanseröz lezyonları ile karşılaşma riski. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi* 2005; 4(2): 78-82.
32. Özer B, Serin E, Coşar A, et al. *Helicobacter pylori* eradikasyon tedavisinde lansoprazol, klaritromisin ve amoksisilin ile ranitidin bizmut sitrat, tedavisinde lansoprazol, klaritromisin ve amoksisilin rejimlerinin etkinliğinin karşılaştırılması. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi* 2004; 3(3): 125-128.
33. McFarlane GA, Munro A. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *B J Surgery* 1997; 84: 1190-1199.

34. Guarner J, Mohar A, Parsonnet J, et al. The association of *H.pylori* with gastric cancer and preneoplastic gastric lesions in Chiapas, Mexico. *Cancer* 1993; 71: 297-301.
35. Lee J, O'Morian C. Who should be treated for *H. pylori* infection A review of consensus and guidelines. *Gastroenterology* 1997; 113: 99-106.
36. Uygun A, Tüzün A, Yeşilova Z, et al. *Helicobacter pylori* eradikasyon tedavisinde 7 ve 14 günlük lansoprazol, amoksisilin, klaritromisin protokolünün karşılaştırılması, *Akademik Gastroenteroloji Dergisi* 2005; 4(3): 172-175.
37. Aydemir S, Bayraktaroğlu T, Üstündağ Y, et al. Standart üçlü tedeavi ile eradikasyon sağlanamayan *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda lansoprazol, ranitidin bizmut sitrat, tetrasiklin ve metronidazolden oluşan dördümlü tedavinin etkinliği. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi* 2004; 3(3): 129-133.
38. Malfertheiner P, Chan FKL, McColl KEL. Peptic ulcer disease. *Lancet* 2009; 374: 1449-1461.
39. Schutze-K, Hentschel E. Duodenal ulcer healing after 7 day treatment a pilot study with lansaprazole, amoxicilline and clarithromycin. *Z Gastroenterol* 1995; 33: 651-653.
40. Kearney DJ, Brousal A. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in clinical practice in the United States: results from 224 patients. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 265-271.
41. Aydemir S, Üstündağ Y, Bayraktaroğlu T, et al. *Helicobacter pylori* için tedavi almış dispeptik şikayetleri olan hastalarda *Helicobacter pylori* prevalansı, *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*, 2004; 3(1): 20-23.
42. Bytzer P and O'Morian C. Treatment of *Helicobacter pylori*, *Helicobacter* 2005; 10: 40-46.
43. Özçakır O, Yılmaz YA. *Helicobater pylori*'de antibiyotik direnci, *Hacettepe Tıp Dergisi* 2007; 38: 75-79.
44. Diaz NJ, Quevedo Alvarez O, Saucedo BL. Determination of Fe, Mn, Zn and Cu in an ethanolic extract of Cuban propolis. *Rev Cienc Quim* 1997; 28: 93-95.
45. Ghisalberti EL. Propolis: a review. *Bee World* 1979; 60: 59-84.
46. Cunha IBS, Sawaya ACHF, Caetano FM, et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2004; 15: 964-970.

47. Duran GG. İn-vitro koşullarda propolisin antibakteriyel, antifungazl ve leyişmayasidal etkilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay 2007; 6-9.
48. Woo KS, Park JS. Eucalyptus propolis beverages with their composition and effects. In Mizrahi A, Lensky Y(eds), Bee Products Properties, Applications and Apitherapy. New York, Plenum Pres, 1997: 125-128.
49. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis . Food Chem Toxicol 1998; 36: 347-363.
50. Sforcin JM, Lopes CAM, Bankova V. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. J of Ethnopharmacol 2000; 73: 243-249.
51. Cunha IBS, Sawaya ACHF, Caetano FM, et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. Journal of the Brazilian Chemical Society 2004; 15: 964-970.
52. Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. J Ethnopharmacol 2007; 113: 1-14.
53. Bankova V, Christov R, Delgado Tejera A. Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands, Phytochemistry 1998; 49: 1411-1415.
54. Marcucci MC, Rodriguez J, Ferreres F, et al. Chemical composition of Brazilian propolis from São Paulo state, Z Naturforsch 1998; 53: 117-119.
55. Vassya S, Bankova, Solange L, De Castro, Maria C. Marcucci Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie 2000; 31: 3-15.
56. Kumova U, Korkmaz A, Avcı BC, Ceyran G. Önemli bir arı ürünü: propolis. Uludağ Arıcılık Dergisi 2002; 2(2): 10-23.
57. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. J of Ethnopharmacol 2005; 100: 114-117.
58. Bankova V. Seasonal variations in essential oil from Brazilian propolis. J of Essential Oil Res 1998; 10: 693-696.
59. Albayrak S. Leishmania tropica üzerine kayseri propolisinin antileishmanial aktivitesinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2009; 5-6.

60. Markham KR, Mitchell KA, Wilkins AL, Daldy JA, Lu Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* 1996; 42: 205-211.
61. Kumova U, Korkmaz A, Avcı BC, Ceyran G. Önemli bir arı ürünü: propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi* 2002; 2(2): 10-23.
62. Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Sforcin JM, et al. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. *Z Naturforsch* 1999; 54: 401-405.
63. Teixeira EW, Negri G, Meira RMSA, Message D, Salatino A. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2005; 2: 85-92.
64. Serra J, Escora R. A study on the bacteriostatic activity of propolis. *Deut Lebensm Rundsch* 1995; 54: 549-553.
65. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC. Antimicrobial action of propolis and its components, the effects on growth membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res* 1997; 152: 239-246.
66. Nostro A, Cellini L, Bartolomeo SD et al. Effect of combining extracts (from Propolis or *Zingiber officinale*) with clarithromycin on *Helicobacter pylori*. *Phytother Res* 2006; 20: 187-190.
67. Nostro A, Cellini L, Bartolomeo SD, et al. Antibacterial effect of plant extract against *Helicobacter pylori*. *Phytother Res* 2005; 19: 198-202.
68. Valcic S, Montenegro G, Mujica A-M, et al. Phytochemical, morphological and biological investigations of propolis from Central Chile. *Z Naturforsch* 1999; 54: 406-416.
69. Vassya S, Bankova, Solange L, De Castro, Maria C. Marcucci Propolis: recent advances in chemistry and plant origin *Apidologie* 2000; 31: 3-15.
70. Dantas AP, Olivieri BP, Gomes FHM, De Castro SL. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. *J Ethnopharmacol* 2006; 103: 187-193.
71. Dantas AP, Salomão K, Barbosa HS, De Castro SL. The effect of Bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(2): 207-211.

72. Özbilge H, Kaya EG, Albayrak S, Silici S. Anti-leishmanial activities of ethanolic extract of Kayseri propolis. *Afr J Microbiol Res* 2010; 4(7): 556-560.
73. Borges-Walmsley MI, Chen D. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends in Microbiology* 2002; 10: 80–87.
74. Rubio OC, Cuellar CA, Rojas N, et al. A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. *J Nat Prod* 1999; 62: 1013-1015.
75. Hegazi AG, Abd Eş, Hady FK, Abd Allah FA. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z Naturforsch* 2000; 55: 70-75.
76. Keskin N, Hazir S, Baser KH, Kurkcuoglu M. Antibacterial activity and chemical composition of Turkish propolis. *Z Naturforsch* 2001; 56: 11-12.
77. Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J Ethnopharmacol* 2005; 99: 69-73.
78. Popova M, Silici S, Bankova V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine* 2005; 12: 221–228.
79. Matsuno T, Jung SK, Matsumoto Y, Saito M, Morikawa J. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. *Anticancer Res* 1997; 17: 3565–3568.
80. Orsolic N, Basic I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J of Ethnopharmacol* 2003; 84: 265–273.
81. Matsushige K. Quality evaluation of propolis. 1.A comparative study on radical scavenging effects of propolis and vespaee midus. *J Trad Med* 1995; 12: 45-53.
82. Basnet P, Matsuno M, Neidlein R. Potent free radical scavenging activity of propolis isolated from Brazilian propolis. *Z Naturforsch* 1997; 52: 587-590.
83. Cengarle L, Carta A, Tilloca G, Marceddu MF. Antioxidant activity of sardinian propolis. *Riv Ital sostanze Grasse* 1998; 75: 551-557.
84. Sun F, Hayami S, Haruna S, et al. In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamins C and E and the level of lipid hydroperoxides in rats. *J Agri Food Chem* 2000; 48: 1462-1465.
85. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(4): 720-741.

86. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18<sup>th</sup> informational supplement. CLSI document M100-S18, Wayne, PA, USA, 2008.
87. Hachem CY, Clarridge JE, Reddy R et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* 1996; 24: 37-41.
88. Takashami J, Chica N, Yoneda K, Ohsaki A. Derisin, a new rotenoid from *Derris malaccensis* plain and anti-*Helicobacter pylori* activity of it's related constituents. J Nat Prod 2002; 65: 611-613.
89. Malekzadeh F, Ehsanifer H, Shahamat M, Levin M, Colwell R. Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*. Int J Antimicrob Agents 2001; (18): 85-88.
90. Kaşifoğlu N. Microbiological diagnosis of *Helicobacter pylori*. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği Dergisi 2007; 29(3): 153-161.
91. Erdoğan Ö, Erbilir F. Kahramanmaraş'ta üretilen bal örneklerinin mikrobiyel kalitesi ve antibakteriyel etkilerinin araştırılması. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi 2007; 10(1): 1-5.
92. Mahady GB, Pendland SL, Stoia A, et al. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. Phytother Res 2005; 19: 998-991.
93. Arif R, Küpeli E, Ergun F. The Biological activity of *Centaurea* L. Species. G. Ü. Fen Bilimleri Dergisi 2004; 17(4): 149-164.
94. Ramos FA, Takaishi Y, Shirotori M, et al. Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) skin. J Agric Food Chem 2006; 17: 3551-3557.
95. Martini S, D'Addario C, Colacevich A, et al. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. Inter J Antimicrob Agents 2009; 34: 50-59.
96. Drago L, Mombelli B, Tocalli L, et al. In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. J Chemother 2000; 12: 390-395.
97. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Ishii E, Midorikawa K, Matsushige K, et al. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. Phytomedicine 2001; 8(1): 16-23.

98. Boyanova L, Gergova G, Nikolov R, Derejian S, Lazarova E, Katsarov N, et al. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. J Med Microbiol 2005; 54: 481-483.
99. Boyanova L, Derejian S, Koumanova R, Katsarov N, Gergova G, Mitov I, et al. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report. J Med Microbiol 2003; 52: 417- 419.
100. Coelho LG, Bastos EMAF, Resende CC, Silva CMP, Sanches BSF, Castro FJ, et al. Brazilian green propolis on *Helicobacter pylori* infection: A pilot clinical study. Helicobacter 2007; 12: 572-574.
101. Silici S, Koc AN. Comparative study of in vitro methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. Lett Appl Microbiol. 2006; 43: 318-324.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ersin KARABULUT**, 1984 yılında Ankara ilinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini sırasıyla Ankara Tuzluçayır İlkokulu ve Namık Kemal İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini Ankara Tuzluçayır Lisesi'nde tamamladı. 2003 yılında Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne girdi, 2007 yılında mezun oldu. 2007 yılında Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

**E-posta:** ersin.karabulut@hotmail.com